



按照专利合作条约(PCT)所公布的国际申请

(51) 国际专利分类号: C07K 14/52, C12N 15/19, A61K 38/19	A1	(11) 国际公布号: WO00/69910 (43) 国际公布日: 2000年11月23日(23.11.2000)
<p>(21) 国际申请号: PCT/CN00/00026</p> <p>(22) 国际申请日: 2000年2月15日(15.02.2000)</p> <p>(30) 优先权: 99107284.7 1999年5月14日(14.05.1999) CN</p> <p>(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 北京医科大学(BEIJING MEDICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 北京北医联合生物工程公司(BEIJING MEDICAL UNIVERSITY UNITED BIOLOGICAL ENGINEERING CO.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区学院路38号, Beijing 100083 (CN)。</p> <p>(72) 发明人;及</p> <p>(75) 发明人/申请人(仅对美国): 马大龙 (MA, Dalong) [CN/CN]; 韩文玲 (HAN, Wenling) [CN/CN]; 张颖妹 (ZHANG, Yingmei) [CN/CN]; 宋泉声 (SONG, Quansheng) [CN/CN]; 狄春辉 (DI, Chunhui) [CN/CN]; 黄家强 (HUANG, Jiaqiang) [CN/CN]; 汤建 (TANG, Jian) [CN/CN]; 陈光慧 (CHEN, Guanghui) [CN/CN]; 中国北京市海淀区学院路38号, Beijing 100083 (CN)。</p> <p>(74) 代理人: 北京三友专利代理有限公司(BEIJING SANYOU PATENT AGENCY CO., LTD.); 中国北京市北三环中路40号, Beijing 100088 (CN)。</p>		<p>(81) 指定国: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)</p> <p>本国际公布: 包括国际检索报告。</p>
<p>(54) Title: CHEMOKINE-LIKE FACTORS HAVING CELL CHEMOKINESIS FUNCTION AND PROLIFERATION-STIMULATING ACTIVITY</p> <p>(54) 发明名称: 具有细胞趋化作用和造血刺激活性的趋化素样因子</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention discloses Chemokine-like factors (CKLF1) having cell chemokinesis function and proliferation-stimulating activity and its variants, nucleotide sequences encoding CKLF1 and its variants, a procedure for producing such CKLF1 by recombinant techniques and an antibody and antagonist against CKLF1. Also disclosed are a pharmaceutical composition containing an effective amount of CKFL1 and acceptable carriers or vehicles and the uses of said CKFL1 and its nucleic acid-encoding sequence as medicines to diagnosis or treat the disorders of immunocyte, tumors, amyotrophia, muscle diseases and alopecia.</p>		

(57) 摘要

本发明公开了一个人类细胞来源的具有细胞趋化活性和促进细胞增殖作用的趋化素样因子 CKLF1 及其变异体, 编码 CKLF1 及其变异体的核苷酸序列, 以基因重组技术生产趋化素样因子的方法和抗 CKLF1 的抗体和拮抗剂。本发明进一步公开了含有有效剂量趋化素样因子和药学上可接受载体或赋形剂的药物组合, 以及所趋化素样因子及其核酸编码序列在制备用于诊断或治疗免疫细胞功能异常疾病、多种原发性肿瘤、造血功能低下、肌肉萎缩、肌肉病变、脱发等病症等疾病的药物中的应用。

以下内容仅供参考

在按照PCT所公布的国际申请小册子首页上所采用的PCT成员国国家代码如下:

AE 阿拉伯联合酋长国	DE 德国	KG 吉尔吉斯斯坦	PL 波兰
AG 安提瓜和巴布亚	DK 丹麦	KP 朝鲜民主主义人民共和国	PT 葡萄牙
AL 阿尔巴尼亚	DM 多米尼加	KR 韩国	RO 罗马尼亚
AM 亚美尼亚	DZ 阿尔及利亚	KZ 哈萨克斯坦	RU 俄罗斯联邦
AT 奥地利	EE 爱沙尼亚	LC 圣卢西亚	SD 苏丹
AU 澳大利亚	ES 西班牙	LI 列支敦士登	SE 瑞典
AZ 阿塞拜疆	FI 芬兰	LK 斯里兰卡	SG 新加坡
BA 波斯尼亚-黑塞哥维那	FR 法国	LR 利比里亚	SI 斯洛文尼亚
BB 巴巴多斯	GA 加蓬	LS 莱索托	SK 斯洛伐克
BE 比利时	GB 英国	LT 立陶宛	SL 塞拉利昂
BF 布基纳法索	GD 格拉纳达	LU 卢森堡	SN 塞内加尔
BG 保加利亚	GE 格鲁吉亚	LV 拉托维亚	SZ 斯威士兰
BJ 贝宁	GH 加纳	MA 摩洛哥	TD 乍得
BR 巴西	GM 冈比亚	MC 摩纳哥	TG 多哥
BY 白俄罗斯	GN 几内亚	MD 摩尔多瓦共和国	TJ 塔吉克斯坦
BZ 伯利兹	GR 希腊	MG 马达加斯加	TM 土库曼斯坦
CA 加拿大	GW 几内亚比绍	MK 前南斯拉夫马其顿共和国	TR 土耳其
CF 中非共和国	HR 克罗地亚	ML 马里	TT 特立尼达和多巴哥
CG 刚果	HU 匈牙利	MN 蒙古	TZ 坦桑尼亚
CH 瑞士	ID 印度尼西亚	MR 毛里塔尼亚	UA 乌克兰
CI 科特迪瓦	IE 爱尔兰	MW 马拉维	UG 乌干达
CM 喀麦隆	IL 以色列	MX 墨西哥	US 美国
CN 中国	IN 印度	MZ 莫桑比克	UZ 乌兹别克斯坦
CR 哥斯达黎加	IS 冰岛	NE 尼日尔	VN 越南
CU 古巴	IT 意大利	NL 荷兰	YU 南斯拉夫
CY 塞浦路斯	JP 日本	NO 挪威	ZA 南非
CZ 捷克共和国	KE 肯尼亚	NZ 新西兰	ZW 津巴布韦

具有细胞趋化作用和造血刺激活性的趋化素样因子

发明领域

本发明涉及新的具有细胞趋化作用和造血刺激活性的趋化素样因子 CKLF1 及其变异体、编码趋化素样因子及其变异体的多核苷酸序列、生产趋化素样因子的方法、趋化素样因子的抗体及拮抗剂，以及趋化素样因子及其核酸编码序列在诊断或治疗免疫系统疾病、造血系统疾病及肿瘤中的应用。

发明背景

细胞因子是指由机体细胞合成并分泌的小分子多肽类因子，它们参与多种细胞的增殖和分化，在机体的生理及病理过程中具有重要作用。细胞因子包括白细胞介素、集落刺激因子、干扰素、肿瘤坏死因子、生长因子、趋化因子等。利用基因工程技术生产的多种重组细胞因子或细胞因子拮抗剂药物已用于临床并收到良好疗效，展示了细胞因子广阔的应用前景。

趋化素 (chemokine, 又称趋化因子) 是一类结构相似、分子量 8-12KD、具有细胞趋化作用的小分子多肽，它们在机体的免疫防御、免疫调节、炎症反应、造血调节、血管生成等方面具有重要作用。大多数趋化因子的氨基酸序列都具有 4 个保守的半胱氨酸，根据第一和第二个半胱氨酸的位置，趋化因子可以分为 CXC、CC、CX₃C 和 C 四个亚家族，其中的 C 代表半胱氨酸，X 代表任一种氨基酸。CXC 趋化因子主要活化和趋化中性粒细胞和 T 淋巴细胞，其基因多数定位于人体第 4 对染色体

上,其成员包括白细胞介素-8 (IL-8)、干扰素诱导蛋白-10 (IFN -IP-10)、MGSA 等。CC 趋化因子主要活化和趋化单核细胞、淋巴细胞、嗜碱性粒细胞及嗜酸性粒细胞等细胞,其基因大多位于第 17 对染色体上,成员包括巨噬细胞炎性蛋白-1 α 、 β (MIP-1 α , β)、巨噬细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、RANTES 等。CX₃C 亚家族目前只发现了 Fractalkine,它具有活化和趋化 T 细胞及单核细胞的功能。C 亚家族目前也只有 Lymphotactin (Ltn) 一个成员,它主要趋化淋巴细胞。趋化因子受体属于 G 蛋白受体家族,它们具有 7 个穿膜区的结构。根据结合趋化因子亚家族成员的不同,趋化因子受体被相应地命名为 CXCR1, 2, 3, 4; CCR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7; CX₃CR 等 (参见 Marco B et al, Human Chemokines: An Update Annu. Rev. Immunol. 1997. 15: 675-705)。由于趋化因子在机体免疫、炎症反应及造血调节等方面的重要作用,趋化因子及其受体的异常变化,如趋化因子或其受体缺陷、趋化因子过度表达、可溶性趋化因子受体水平的增加往往会引起某些感染性疾病、自身免疫性疾病甚至肿瘤的发生,因而对趋化因子的检测可以用于疾病的辅助诊断、病程观察、疗效判断及治疗监测等过程。近年还发现人类免疫缺陷病毒 (HIV) 可以通过与趋化因子受体的结合入侵机体的免疫细胞,提示趋化因子与 HIV 的感染和致病过程密切关联,用趋化因子做药物可能会阻断 HIV 侵入免疫细胞 (Cocchi F, et al. Identification of RANTES, MIP-1, and MIP-1 as the Major HIV-Suppressive Factors Produced by CD8+ T Cells. Science, 15 December 1995, p. 1811)。此外,用基因工程方法生产的趋化因子及其相关药物已经陆续进入临床试验,有望

成为新一代的生物技术药物。例如，髓样造血祖细胞抑制因子 (MPIF-1) 被作为造血保护剂用于大剂量的肿瘤放、化疗 (Marshall A, HGS launches "first" genomics product in clinic. Nat Biotechnol 1998, 16:129)。

本发明的构思如下：鉴于有丝分裂原植物血凝素 (PHA) 能够刺激产生多种细胞因子或趋化因子 (Brantschen S, Gauchat JF, de Weck AL et al. Differential expression of cytokine mRNAs in human cell lines. Lymphokine Res 1989 8(3):163-72)，而白细胞介素-10 (IL-10) 是一个广谱的细胞因子抑制剂 (Di-Hwei, H et al, Science, 1990, 250, 830)，通过抑制性递减杂交 (SSH) 技术 (Diatchenko L, Y FC, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc Natl Acad Sci USA. 1996, 93:6025-30)，或许能够找到目前尚未发现的受 IL-10 抑制的细胞因子。基于上述思路，本发明人利用抑制性递减杂交 (SSH) 技术，从人髓样白血病细胞系 U937 的 cDNA 中分离并克隆了趋化素样因子 CKLF1 的基因，并公开了 CKLF1 及其变异体的生物学活性及功能。

发明概述

本发明的第一个目的是提供一个具有免疫细胞趋化作用及造血刺激活性的趋化素样因子 CKLF1 (chemokine like factor 1, 简称 CKLF1)，以及趋化素样因子 CKLF1 的变异体、类似物、衍生物及多肽片段。

本发明的第二个目的是提供编码趋化素样因子及其类似物的多核苷酸序列，所述多核苷酸包括 DNA、cDNA、基因组 DNA 及 mRNA。

本发明的第三个目的是提供以 DNA 重组技术生产趋化素样因子的方法，该方法包括用基因工程的技术将趋化素样因子的编码序列克隆到适合的载体，然后通过转导、转染或转化等方法，将重组体转入原核或真核宿主细胞，并从宿主细胞得到表达产物，包括从培养基或溶胞产物中回收表达产物。

本发明的第四个目的是提供所述趋化素样因子或编码趋化素样因子的核酸序列，在制备用于诊断或治疗免疫细胞功能异常疾病、多种原发性肿瘤、造血功能低下等疾病的药物中的应用。

本发明的第五个目的是提供含有趋化素样因子或其活性成分的药物组合物，所述药物组合物包括将趋化素样因子或其活性成分与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂相混合。

本发明的第六个目的是提供对所述趋化素样因子具有特异性的多克隆或单克隆抗体。

本发明的第七个目的是提供用于抑制所述趋化素样因子作用的拮抗剂，以及拮抗剂在治疗类风湿性关节炎、自身免疫病、肿瘤、病毒感染等疾病中的应用。

为了更清楚地理解本发明的实质，现参照下列附图和实施例对其进行解释，附图和实施例的目的只是为了解释而不以任何方式限制本发明。

附图及序列表简要说明

图 1 是 U937 细胞白细胞介素-10 抑制表达研究中抑制性底物杂交 (SSH) 的示意图。

图 2 是 CKLF1 及其变异体 CKLF2, 3, 4 的结构示意图。

图 3 是 Northern blot 检测 U937 细胞中 CKLF1 mRNA 的表达。

图 4 是 pMTY4-CKLF1 在原核细胞中的表达结果。

图 5 由图 5A-I 的 9 幅图组成, 显示了趋化素样因子 CKLF1 对多种细
5 胞的趋化活性, 其中,

图 5A 显示重组 CKLF1 转染上清对 DMSO 刺激的 HL-60 细胞的趋化作用;
用;

图 5B 显示重组 CKLF1 转染上清对小鼠腹腔巨噬细胞的趋化作用;

图 5C 显示重组 CKLF1 转染上清对小鼠淋巴细胞的趋化作用;

10 图 5D 显示重组 CKLF1 转染上清对单核细胞 (PBMC) 的趋化作用;

图 5E 显示重组 CKLF1 转染上清对噬中性粒细胞细胞的趋化作用;

图 5F 显示重组 CKLF1 转染上清对 U937 细胞的趋化作用;

图 5G 显示重组 CKLF1 转染上清对 K526 细胞的趋化作用;

图 5H-I 分别显示人 CKLF1 对小鼠腹腔巨噬细胞和淋巴细胞的趋化效
15 应。

图 6 是 CKLF1 的重组表达载体 pcDI-CKLF1 的构建示意图。质粒
pcDI-CKLF2, 3, 4 的构建与其类似。

图 7 显示 CKLF1, 2, 3 蛋白质对小鼠骨髓细胞的促增殖作用。

图 8 由图 8A 和图 8B 组成, 显示 CKLF1 刺激后, 小鼠骨髓细胞的形
20 态变化: 图 8A 为 pcd I 组小鼠骨髓细胞形态; 图 8B 为 pcd I - CKLF1
组骨髓细胞形态。

图 9 是利用 MTT 法测 CKLF1 转染上清对人骨髓细胞的促增殖作用的
结果。

图 10 是 CKLF1 刺激形成的人骨髓细胞集落形态 (培养 20 天)。

图 11 包括 11A-11D, 其中图 11A-B 显示了 CKLF1 及其变异体在正常成人组织中的表达; 图 11C、11D 分别显示了 CKLF1 及其变异体在胚胎组织和多种肿瘤组织中的表达。

5 图 12A-B 显示了小鼠骨骼肌注射 pcDI-CKLF1 10 天后, AcP 染色观察注射部位横断面组织的结果, 图 12A 为实验对照组, 小鼠骨骼肌注射 pcDI-CKLF1 10 天后注射部位横断面组织, AcP 组织化学染色, HE 复染, 40×; 图 12B 为实验组, 鼠骨骼肌注射 pcDI-CKLF1 10 天后注射部位横断面组织, AcP 组织化学染色, HE 复染, 40×。

10 图 13A-B 显示了小鼠骨骼肌注射 pcDI-CKLF1 10 天后, HE 染色观察注射部位纵切面组织的结果, 图 13A 为对照组, HE 染色, 40×; 图 13B 为实验组, HE 染色, 40×。

序列表中 SEQ ID NO: 1 显示了趋化素样因子 CKLF1 的核酸序列, 其中包括 CKLF1 的 cDNA 编码区序列。SEQ ID NO: 2 显示了由 SEQ ID NO: 1 的编码序列推测的 CKLF1 氨基酸序列。SEQ ID NO: 3 显示了趋化素样因子变异体 CKLF2 的核酸序列, SEQ ID NO: 4 显示了由 SEQ ID NO: 3 推测的 CKLF2 氨基酸序列。SEQ ID NO: 5 显示了趋化素样因子变异体 CKLF3 的核酸序列, SEQ ID NO: 6 显示了由 SEQ ID NO: 5 推测的 CKLF3 氨基酸序列。SEQ ID NO: 7 显示了趋化素样因子变异体 CKLF4 的核酸序列, SEQ ID NO: 8 显示了由 SEQ ID NO: 7 推测的 CKLF4 氨基酸序列。

发明详述

根据本发明的第一个目的, 本发明提供了一个具有免疫细胞趋化作用及造血细胞刺激活性的趋化素样因子 CKLF1, 所述趋化素样因子 CKLF1 具有如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列或保藏登记号 CGMCC No. 0392

大肠杆菌中的重组质粒编码的氨基酸序列。CKLF1 是由 SEQ ID NO: 1 所示的核酸序列编码产生的。趋化素样因子最初被称为 U937 细胞来源的趋化因子 (U937-derived chemokine, 简称 UCK), 后经国际基因标准化命名委员会 (International Committee on Standardized Genetic Nomenclature) 建议, 将其命名为趋化素样因子 (chemokine like factor, 简称 CKLF)。

CKLF1 由 99 个氨基酸残基组成, 分子量为 10,923 道尔顿。氨基酸序列分析显示: CKLF1 具有趋化因子 CC 亚家族的显著特征, 序列中存在两个连续的半胱氨酸。CKLF1 没有明显的信号肽序列、DNA 结合位点及 N-糖基化位点, 其氮端的 12-20 位氨基酸为疏水区, 可能含有天然切割位点。CKLF1 与已知蛋白无明显同源性, CKLF1 的第 35-79 位氨基酸与线虫 permease 蛋白有 46% 的同源性。CKLF1 属于分泌性蛋白, 可以在人体结肠、胰腺、脑、心脏和胚胎组织以及在相关组织来源的肿瘤中检测到 CKLF1。实验表明 CKLF1 具有明显的趋化作用和促进造血细胞和骨骼肌细胞增殖作用 (参见实施例 6, 7, 8, 10)。

本发明还涉及趋化素样因子的变体, 变体可以包括本发明人已检测并命名为 CKLF2、CKLF3 和 CKLF4 的多肽, 它们分别具有 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列, 以及相应的 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 7 所示的核酸序列。CKLF2、CKLF3 和 CKLF4 依次具有 152、67 和 120 个氨基酸, 这几种变体可能是 CKLF1 基因不同的剪切过程形成的。可以在结肠癌、肺腺癌、前列腺癌、卵巢癌等多种肿瘤组织中以及胚胎组织中检测到 CKLF2、CKLF3 和 CKLF4 的存在。尤其是 CKLF2 在正常细胞少量表达, 而在多种原发性肿瘤细胞和胚胎细胞中表达水平较高。

本发明还涉及所述趋化素样因子的类似物、衍生物及多肽片段。趋化素样因子类似物是指与趋化素样因子具有至少 70%，较好 90%，最好 95%同源性的多肽。“同源性”是通过多肽之间氨基酸序列的比较以及保守氨基酸残基的数量而确定的。趋化素样因子的衍生物是指 CKLF1 氨基酸序列中的一或多个残基带有取代基团，衍生物也包括具有附加序列的、或与其他化合物融合的 CKLF1。例如为了便于纯化，在 CKLF1 的侧翼融合其它的氨基酸残基，又如与聚乙二醇或脂质融合以提高多肽的半寿期。所谓趋化素样因子的多肽片段是指具有部分或全部 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的多肽，它至少由 20 个氨基酸组成，最好由 40 个以
10 上的氨基酸组成，多肽片段最好具有与 CKLF1 相同或相似的生物学活性。

本发明的多肽可以是天然产生的，或化学合成的，或用 DNA 重组技术由原核或真核细胞产生的，或用衍生于 CKLF1 核酸序列的 mRNA 在无细胞翻译系统中产生。优选重组产生的多肽。化学合成可以用 CKLF1 的多肽片段作中间体，进而合成全长的趋化素样因子。重组生产方法中可以
15 选用不同的宿主，因此本发明的多肽可以是糖基化或非糖基化的，并且可以包括一个起始蛋氨酸残基。

本发明的趋化素样因子最好是以分离的形式提供的，更好是经过纯化的。“分离的”是指脱离了原有环境的存在状态，如脱离了生物活体
20 或脱离了天然的生存环境。

根据本发明的第二个目的，本发明提供了趋化因子 CKLF1 的核酸序列。如 SEQ ID NO: 1 所示，CKLF1 的核酸序列全长 552 个碱基，带有 polyA

和 ATTAAG 加尾信号，其中的第 152 - 449 位是编码序列。CKLF1 的核酸序列与已知的基因无明显的同源性，在 Genebank 的注册登记号为 AF096895。

本发明所述的核酸序列可以是 DNA 或是 RNA，其中 DNA 包括 cDNA、
5 基因组 DNA 以及合成的 DNA，DNA 可以是双链或是单链形式，单链 DNA 可以是编码链或是非编码链(反义链)。所述趋化素样因子的核酸序列最好是以分离形式提供的，分离的核酸序列可以只包括成熟多肽的编码序列，也可以包括成熟多肽的编码序列和附加编码序列，还可以包括成熟多肽的编码序列和非编码序列，例如内含子、编码序列 5' 或 3' 端的非
10 编码序列等。趋化素样因子的编码序列可以完全相同于 SEQ ID NO: 1 所示的编码序列或保藏菌种 CGMCC No. 0392 重组体携带的编码序列，此外由于遗传密码的简并性，它可以不同于 SEQ ID NO: 1 所示的或保藏物所携带的编码序列。

CKLF1 的基因片段可作为寡核苷酸探针来分离 CKLF1 全基因或探索
15 与其有高度同源性的核酸序列。探针至少含有 30 个碱基，最好含有 50 个以上的碱基。在合适的条件下用标记的探针与 cDNA 文库、基因组 DNA 文库或 RNA 文库杂交，从中可以分离出与探针杂交的核酸序列。与探针杂交的核酸序列可以具有至少 10 个碱基，最好 30 个以上的碱基。

本发明进一步涉及 CKLF1 变异体的核酸序列，具体地说是 CKLF 2、
20 CKLF3 和 CKLF4 的核酸序列，依次如序列表中 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 7 所示。这些序列编码的蛋白产物相对于 CKLF1 没有发生移码变化，可以视作 CKLF1 核酸编码序列的等位基因变异体。可以

在 1999 年 10 月以后 GenBank 公布的资料中查询到上述序列, CKLF2 为 AF135380; CKLF3 为 AF135381; CKLF4 为 AF145216。

本发明还涉及与 CKLF1 的基因序列至少有 70%, 较好 90%, 最好 95% 同源性的多核苷酸序列。特别涉及在严格条件下与上述 CKLF1 基因杂交的多核苷酸, 所说的“严格条件”意指发生杂交的前提是序列间至少具备 95% 的同源性。这样的序列可以是天然存在或人工产生的, 可以包括 CKLF1 核酸序列的等位基因变异体、也可以包括 CKLF1 核酸序列中碱基的缺失、插入及置换。这样的序列编码的多肽可以在功能上与本发明的 CKLF1 相同、相似、或不同, 但最好是编码与 CKLF1 生物学活性基本相同的多肽。

根据本发明的第三个目的, 本发明提供了用 DNA 重组技术生产趋化素样因子的方法, 其中涉及携带所述 CKLF1 核酸序列的载体、载体转入宿主细胞的途径、带有载体的宿主细胞以及由宿主细胞产生多肽的方法。

可以通过限制性内切酶位点将 CKLF1 基因引入载体。载体可以是染色体来源、非染色体来源或人工改造的, 例如 SV40 的衍生物、细菌质粒、噬菌体 DNA、酵母质粒、噬菌粒(由质粒和噬菌体 DNA 组合体衍生的载体)、以及病毒(如杆状病毒、牛痘病毒、腺病毒、家畜痘病毒)载体。载体一般带有复制原点、启动子、选择标志等遗传元件。启动子的例子有 RSV、HIV、CMV 或 SV40 启动子、大肠杆菌 lac 或 trp 启动子、噬菌体 λ P_L 启动子等。选择标志基因的例子有适用于真核细胞的新霉素抗性 or 二氢叶酸还原酶基因, 适用于大肠杆菌的氨苄青霉素或四环素抗

性基因。表达载体还可以带有启动翻译的核糖体结合位点和转录终止子序列。用于真核细胞的表达载体一般带有 CMV、SV40、HSV 胸苷激酶等真核细胞启动子和增强子（通过作用于启动子提高转录效率，由 10-300 个核苷酸组成的顺式作用元件）等调控元件，必要时还可在启动子和结
5 构基因之间插入一段指导翻译产物向周质或细胞外分泌的前导序列。适用于真核细胞的载体包括 pMT-hIL3(马大龙, 狄春辉, 庞健等, (1991) 高技术通讯 11: 26-29), pQE-9(Qiagen), pD10 和 pNH18A(Stratagene), pKK233-3、pDR540 和 pRIT5(Pharmacia), pcDNA3 (Invitrogen?), pCI (Promega), pWLNEO 和 pSG(Stratagene)、pSVL(Pharmacia)。

10 携带本发明 CKLF1 基因的载体可以通过转导、转化或转染的方法转入宿主细胞。常用的方法包括氯化钙转染法、脂质体转染法、电穿孔法或微粒轰击法。可以选择任何适当的宿主细胞表达本发明的 CKLF1 基因, 例如细菌细胞如大肠杆菌、芽孢杆菌、链霉菌等, 真菌细胞如酵母细胞等, 昆虫细胞如果蝇、中国家蚕细胞等, 哺乳动物细胞如 CHO、COS
15 和 HEK293 细胞等, 以及人细胞如 TF-1、U937 和 Hela 细胞等。在本发明的实施例方案中, 选择了高等真核细胞如哺乳动物细胞及人肿瘤细胞, 低等真核细胞如酵母细胞, 及原核细胞如大肠杆菌细胞作为宿主细胞。

宿主细胞可以在普通营养培养基中或特殊培养基中生长。特殊培养基是指为活化启动子、筛选转化体或扩增基因等目的而特别配制的培养基。温度、pH 值等培养条件依不同的宿主细胞而定, 待宿主细胞的生长密度适合时, 可以用任何已知的方法, 如冻融法、超声处理法、溶菌

酶溶解法或机械破碎法破碎细胞。并从宿主细胞或培养基中回收和纯化本发明的 CKLF1 及其变异体多肽，方法包括硫酸铵或乙醇沉淀法、酸萃取法、超滤法、离子交换层析法、磷酸纤维素层析法、疏水相互作用层析法、凝胶过滤法、亲和层析法及高压液柱层析法。

5 根据本发明的第四个目的，本发明公开了 CKLF1 及其编码序列在疾病治疗和的诊断中的用途。第一，CKLF1 具有广谱的细胞趋化作用（参见实施例 5），提示它可以用于感染性疾病等多种病症的治疗。例如，对炎症细胞的趋化作用使其有可能作为抗炎症药物治疗自身免疫性疾病。

10 第二，CKLF1 具有促进骨髓细胞增殖及集落形成的作用，如实施例 7，8 所示。因而可以刺激机体的造血功能，用于治疗造血系统疾病，包括原发性或继发性造血功能障碍等病症。

第三，CKLF1 具有促进细胞增殖的作用。在实施例 10 中，CKLF1 可以在体内刺激骨骼肌细胞和毛囊增殖，因此可以用它治疗肌肉萎缩或其他退行性病变。应该提及的是增殖中的骨骼肌细胞更易于接受外源 DNA，15 因而在使用 DNA 疫苗或注射 DNA 药物治疗疾病时，可以同时注射 CKLF1 以促进 DNA 疫苗或药物的吸收，提高免疫及治疗效果。本发明的 CKLF1 具有体内刺激毛囊细胞增殖的作用，可以用作促进毛囊增生剂治疗脱发症。

20 第四，CKLF1 基因在多种组织和细胞中表达，尤其是在胚胎组织和肿瘤细胞中高水平表达（参见实施例 9）。可以用本发明的核酸序列作诊断试剂，结合限制性片段长度多态性分析（RFLP）、荧光原位杂交法

(FISH)等方法,检测体内突变的 CKLF1 基因以诊断因 CKLF1 表达不足或过量所致的病理状态。也可以用 CKLF1 蛋白的纯化产物,通过放射免疫分析、竞争性结合法、Western 印迹分析或酶联免疫吸附法(ELISA)达到同样目的。

- 5 根据本发明的第五个目的,本发明的 CKLF1 及其活性成分可以与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂相混合以制备药物组合物。可以根据治疗目的、给药途径的需要将药物组合物制成多种剂型,例如溶液剂、脂质体包裹剂、微胶囊剂及其他缓释制剂。载体或赋形剂的例子包括生理盐水、等渗葡萄糖溶液、缓冲盐水、甘油、乙醇及上述溶液的组
- 10 合。可根据需要在组合物中添加辅助成:例如与本发明 CKLF1 有协同作用的化合物;又如人血清白蛋白、低分子量肽,氨基酸(如甘氨酸或赖氨酸)和金属阳离子(如 Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} 和 Ca^{2+})等蛋白保护剂;聚乙二醇、羧甲基纤维素、多聚甘氨酸、谷胱甘肽等稳定剂;蛋白酶抑制剂及自由基清除剂;以及在粘膜或皮肤局部给药的情况下,添加二甲基亚砷或月
- 15 桂氮卓酮等皮肤渗透剂。

- 根据本发明的第六个目的,可以用本发明的 CKLF1 多肽及其片段、类似物或衍生物作为免疫原制备相应的抗体。抗体可以是多克隆或单克隆抗体,可以是嵌合的、单链的或人源化抗体及其 Fab 片段。可以用杂交瘤技术生产人单克隆抗体,可以用转基因小鼠制备人源化抗体。可以
- 20 用 CKLF1 的抗体来分离趋化素样因子,由 CKLF1 的多肽片段产生的抗体也能够与整个趋化素样因子结合。

根据本发明的第七个目的,本发明涉及可以阻断或封闭 CKLF1 活性

的 CKLF1 拮抗剂。拮抗剂可以与一或多种药学上可接受的载体、赋形剂或辅料结合形成药物组合物。将本发明的拮抗剂作为疫苗导入肿瘤细胞,有可能在肿瘤治疗中发挥疗效。拮抗剂同样有可能应用于治疗类风湿性关节炎等自身免疫病、变态反应、异常增生性疾病及病毒感染等疾病。

最佳实施方案

下述实施例并不以任何方式,构成对本发明创作权利要求范围的限制。

实施例 1: 从 U937 细胞 cDNA 中分离 IL-10 抑制的相关基因

1.1 细胞培养

U937 细胞由本室长期传代培养。细胞培养在含 10%胎牛血清,100U/ml 青链霉素的 RPMI1640 培养基中。每 3-4 天传代一次。细胞批量培养至 2×10^7 细胞,离心,收集细胞用 Hank's 液洗三遍后悬于含 10ng/mlPHA 的 10% FCS RPMI1640 中,其中半数细胞(1×10^7 细胞)作为 SSH 中的 tester, 另一半细胞中加入终浓度为 100ng/ml 的 IL-10 作为 driver,继续培养 8 小时后收集细胞,用于提取 mRNA 合成双链 cDNA。

1.3 双链 cDNA 的合成

用 Pharmacia 公司的 QuickPrep® micro mRNA purification kit, 依照说明书提取 U937 细胞的 mRNA。用 CLONTECH 公司 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 提供的试剂和酶,分别以上述 Driver 和 Tester mRNA 为模板,依照说明书合成单链及双链 cDNA。

1.4 SSH 差示杂交

如图 1 所示, tester 和 driver 组 cDNA 2μg 用 RsaI 切后,分为两组的 tester 在连接酶作用下分别与 Adapter1 和 Adapter2 连接。与变

性 driver 杂交后，将两组杂交产物混合物并加入变性 driver。再次杂交的产物稀释 1000 倍，利用试剂盒提供的 PCR 引物，第一轮 PCR 扩增 27 个循环。将第一轮 PCR 产物稀释 10 倍，以 NESTED 引物 1 和 NESTED 引物 2 进行第二轮 PCR，扩增 15 个循环。扩增产物即为差异基因片段，回收 200-1600bp 的片段克隆至 pGEM-T easy 载体 (promega 公司)，转化 XL-Blue 菌后筛选阳性克隆。

1.6 测序反应:

测序质粒用 Qiagen 公司 tip-20 Miniprep Kit 纯化，用 ALFexpress II 自动 DNA 测序仪 (Pharmacia) 在大连宝生生物工程公司测序。

结果

测得的序列如 SEQ ID NO: 1 所示，用 EST Assembly Machine (<http://www.tigem.it>) 进行序列拼接。用于 CKLF1 拼接的 EST 片段编号为 W38899, N95062, AA429945, AA987264, AA927461, W19056, N89912, AA516431, AA479657, AA455042, AA989129, W52820。拼接后得到完整 CKLF1 的 cDNA 序列，序列分析显示 CKLF1 全长 cDNA 为 534bp，包括 Poly A 序列及 "ATTAAA" 加尾信号。从第 152-449 个碱基为开放读码框架，编码 99 个氨基酸。通过国际互连网 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 与 GenBank 中的序列进行同源性比较，新基因 CKLF1 的登记号为 AF096895。

用网站 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 提供的 PcGene、Prosite 和 Signal P server 软件分析 CKLF1 的氨基酸序列 (如 SEQ ID NO: 2 所示) 特征。分析表明 CKLF1 蛋白结构中存在 2 个连续的半胱氨

酸(CC), 具有趋化因子 C-C 家族的特征。成熟蛋白的第一个氨基酸是甘氨酸。CKLF1 没有典型的信号肽序列, 其 N 端的 17 个疏水性的氨基酸可能是前导序列, 未发现穿膜区序列、DNA 结合位点及 N-糖基化位点。多肽同源性分析发现 CKLF1 的 35-79 位氨基酸与线虫 (*Caenorhabditis*
5 *elegans*) 的 permease 蛋白有 46% 的同源性, 与其它蛋白无同源性。

实施例 2 CKLF1 变异体的发现

根据 CKLF1 编码区设计引物 P1 和 P2 的序列如下:

P1: 5' ATG GAT AAC GTG CAG CCG AAA AT 3'

10 P2: 5' CCG CTC GAG TTA CAA AAC TTC TTT TTC 3'

以 P1 和 P2 为引物, 分别以 PHA 刺激, PHA 刺激、IL-10 抑制的 U937 细胞 cDNA 文库为模板进行半定量 RT-PCR。扩增条件如下: 94 °C, 2 分钟; 94 °C, 15 秒, 58 °C, 15 秒, 72 °C, 30 秒, 30 个循环; 72 °C, 7 分钟。

15 结果

从两个 cDNA 文库中扩增出不同大小的 PCR 产物, 克隆入 pGEM-T Easy 载体, 测序得到变异体 CKLF2、CKLF3 和 CKLF4 的核酸序列, 分别如 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7 所示, 在 GenBank 中的登录号依次为 AF135380, AF135381, AF145216。

20 如图 2 所示, 相对于 CKLF1 的核酸序列 (SEQ ID NO: 1) 而言, CKLF2, 3, 4 的核酸序列没有移码突变, 它们分别编码 152 个、67 个和 120 个氨基酸。CKLF2、CKLF3、CKLF4 的氨基酸序列依次如 SEQ ID NO: 4、SEQ

ID NO: 6、SEQ ID NO: 8 所示。CKLF3 具有保守的氨基端和羧基端序列, CKLF2 和 CKLF4 各自具有不同的外显子序列。PcGene 分析显示 CKLF2 和 CKLF4 有穿膜区。变异体可能是 mRNA 的不同剪切造成的。

5 实施例 3: Northern blot 检测 U937 细胞中 CKLF1 mRNA 的表达

用 GIBCO-BRL 公司的 TRI_{20L}TM 试剂提取组织及细胞的总 RNA。分别取 1×10⁷ tester 组和 driver 组 U937 细胞, 离心后加入 1ml TRI_{20L}TM 试剂, 破碎细胞后加入 0.2ml 氯仿, 离心后的上清用异丙醇沉淀, 乙醇洗涤, 干燥后的总 RNA 复悬于无 RNase 的 H₂O 中, 用分光光度计 (Beckman 公司, 10 640nm) 定量。

每 4 倍体积的 RNA 样品加入 1 倍体积的 5X RNA 上样缓冲液, 混匀 65 °C 孵育 3-5 分钟, 冰浴。本实验每个上样孔中的 RNA 均为 20 μg。在 5-7 V/cm 的电压下、1.2% 的甲醛变性胶上电泳, 用毛细管吸引法将 RNA 转到尼龙膜上。

15 用探针标记 SSH 杂交得到的 CKLF1 全长 EST 片段, 随机引物荧光素标记试剂盒 (DuPont NEN[®] NELMGC-803, Random Primer Fluorescein Labeling kit with Antifluorescein-HRP) 购自 DUPONT 公司, 标记、杂交、洗膜及显色的操作详见说明书。

结果

20 由图 3 可见: CKLF1 基因大小约 500bp, 在 PHA 培养 8 小时后的 U937 细胞中高表达, IL-10 能够抑制其表达。

实施例 4 CKLF1 在原核细胞中的表达

4.1 原核表达载体的构建

根据 CKLF1 的 cDNA 序列设计上、下游引物 P1 和 P2:

P1': 5' CTG ATA CCA GAA ACC ACA ACA TT 3'

P2': 5' GGA AGA ATA CAG AAA TAT GTT TAA TAC 3'

以实施例 1 中的测序质粒为模板, P1'和 P2' (带有 XhoI 酶切位点)
5 为引物进行 PCR 扩增。PCR 产物用 Klenow 去除 3'端多余的碱基 "A",
用 XhoI 酶切后, 与 StuI-XhoI 酶切的 pMTY4 连接, 构建重组质粒 pMTY4
CKLF1。

4.2 CKLF1 的表达及纯化

pMTY4CKLF1 能够在 42℃ 的温度诱导下, 在 pop2136 大肠杆菌中以包
10 涵体的形式表达融合蛋白 MS2-CKLF1, 两种表达产物由带凝血酶切点的
多肽连接。收集细菌, 超声裂解包涵体, 包涵体在 8M 尿素, 20mM
Glycine-NaOH (pH10.0) 中 37℃ 变性 30 分钟、尿素稀释至 1M 复性, 凝
血酶 25℃ 酶切过夜。利用 Q-琼脂糖凝胶离子交换层析进行蛋白纯化。
酶切后的蛋白在 20mM Glycine-NaOH (pH10.0) 中上样, 用 50mM Tris-
15 HCl (pH 8.9) 洗柱, 在 0.04 M NaCl 盐浓度洗脱下目的蛋白。

结果

如图 4 所示: MS2-CKLF1 融合蛋白在大肠杆菌中得到高效表达, 表
达量约占菌体蛋白的 30%, 并且有双体蛋白存在, 双体分子约占单体表
达蛋白质的 1/4。

20

实施例 5 CKLF1, 2, 4 在真核细胞内的定位

重组质粒的构建类似实施例 4, P1'和 P2'扩增 CKLF1, 2, 4 片段, PCR
产物用 Klenow 处理、XhoI 酶切, 载体 pEGFP-C3 (购自 CLONTECH 公司)
经 EcoRI 切割、Klenow 处理后再用 SalI 酶切, 表达载体 pEGFP-C3-CKLF1
25 可在真核细胞中表达加强的绿色荧光蛋白 (EGFP) 和 CKLF1 的融合蛋白,

CKLF1 的读码框架与 EGFP 的一致。

利用 SuperFect (Qiagen 公司) 将 pEGFPC3-CKLF1, 2, 4 转染进 Hela 细胞, 转染的细胞爬片, 72 小时后, 玻片用 PBS 洗三遍, 用 PBS 或 4% 多聚甲醛固定, 室温放置 30 分钟后用 PBS 清洗。在荧光显微镜下观察

5 CKLF1 所在的部位。

结果

观察到荧光标记的 CKLF1 在细胞内少量弥散性存在, 结合 COS-7 细胞的转染上清活性实验, 表明 CKLF1 为分泌型蛋白; 荧光标记的 CKLF2 和 CKLF4 主要存在于细胞膜上。

10

实施例 6: CKLF1 的细胞趋化作用

6.1 细胞及细胞株的制备:

K562 细胞是人慢性粒白血病细胞株, U937 细胞是人髓性白血病细胞株, TF-1 是人红系白血病细胞株, HL-60 细胞是人早幼粒白血病细胞
15 株, 在常规细胞培养基 1640 中加入 1.3% DMSO, 培养 4 天, HL-60 分化为粒系白细胞。

外周血嗜中性粒白细胞, 淋巴细胞和单核细胞的分离: 取健康成人外周血 12ml, 加入终浓度 25-50 单位/毫升无防腐剂肝素注射液和 2 倍体积 Hank's 液, 轻轻混匀, 分别取 4 ml Hank's 液稀释后的抗凝血缓缓
20 加入含 2 ml Ficoll-Hypaque ($1.077 \text{ g/cm}^3 \pm 0.002$) 分层液中, 2000 转/分钟, 4°C 离心 25 分钟, 吸取血浆与分层液界面的单核细胞, 将单核细胞悬于 1640 中 37°C 培养 30 分钟, 上清中的非粘附细胞即淋巴细胞, 将平皿中加入 5%FCS 的 1640 和 0.5% EDTA, 消化粘附的单核细胞, 即可得到淋巴细胞和单核细胞; 吸取红细胞上面的粒细胞, 用 PH7.2 的

NH₄Cl-Tris 溶解残留的红细胞以纯化粒细胞。

6.2 趋化实验

用 EcoRI 从 pGEM-T 切下 CKLF1 基因片段, 将其克隆入用 EcoRI 酶切的 pcDI 载体, 得到重组质粒 pcDI -CKLF1 (+)。用 pcDI 空载体作对照, 将 pcDI 和 pcDI-CKLF1 的转染上清作倍比稀释, 加入趋化小室下层孔。调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 加入趋化小室上层孔。嗜中性粒细胞 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时, 其余细胞孵育 3 小时。取膜, 刮去非特异细胞, 甲醇固定, Giemsa 染色。在 40 倍显微镜下, 随机选 5 个视野记数, 取平均值计算趋化指数 (实验组迁移的细胞数与对照组非特异迁移的细胞数的比值)。

10 结果

如图 5 A-I 所示, pcDI-CKLF1 的转染上清对人外周血的嗜中性粒细胞, 单核细胞, U937 细胞, K562 细胞和 DMSO 刺激的 HL-60 细胞和小鼠腹腔巨噬细胞及淋巴细胞具有明显的趋化作用, 而对 TF-1 细胞, NFS-60 细胞及未经刺激的 HL-60 细胞没有趋化作用。这表明 CKLF1 是一个具有广谱趋化活性的分泌蛋白。强还原剂 DTT 能够完全阻断 CKLF1 的趋化活性。CKLF1 的趋化作用表现出剂量依赖性。

实施例 7: CKLF1, 2, 3 对小鼠骨髓细胞增殖作用分析:

7.1 真核表达载体的构建

20 质粒 pCI 购自 Promega 公司, pcDNA3 购自 Invitrogen 公司, 质粒 pcDI 为本室构建, 是将 pcDNA3 的 BglII-KpnI 片段与 pCI 的 BglII-KpnI 片段置换后得到的一个真核表达质粒。

以 P1 和 P2 为引物, 从 PHA 刺激的 U937 细胞 cDNA 文库中扩增 CKLF1,

2, 3 基因, 分别将其克隆到 pGEM-T easy 载体, 用 EcoRI 酶切产生带有粘末端的基因片段, 再将其克隆到真核表达载体 pcDI 的 EcoRI 位点中, 筛选正确插入的质粒, 分别命名为 pcDI-CKLF1, 2, 3 (如图 6 所示)。用高效转染剂 Superfect (Qiagen 公司) 将纯化质粒转入 COS-7 细胞, 收集转染上清用作活性分析。

7.2 MTT 法测定细胞的增殖

取 Balb/c 小鼠骨髓细胞, 用 pH7.2 的 NH_4Cl -Tris 溶解红细胞, 调整细胞浓度至 $1.5 \times 10^6/\text{ml}$, 铺到 96 孔细胞培养板中, 阴性对照组为培养 72 小时的 COS-7 细胞上清 ($10\mu\text{l}$), 阳性对照组为终浓度 $100\text{ng}/\text{ml}$ 的小鼠 IL-3 和 SCF。实验组分别加 $10\mu\text{l}$ pcDI-CKLF1, pcDI-CKLF 2 和 pcDI-CKLF 3 转染上清, 每组做 6 个复孔, 37°C , 5% CO_2 培养 90 小时后, 加入 $10\mu\text{l}$ $10\text{mg}/\text{ml}$ 的 MTT, 6 小时后加裂解液 (50% DMSO, 20% SDS, pH 4.4), 用酶标仪测定 570nm 的光吸收值。

结果

如图 7 所示, CKLF1, 2 转染上清对小鼠骨髓细胞有明显的促增殖作用, CKLF3 的作用较弱。细胞培养 72 小时时, 各组细胞之间没有明显区别, 有较多细胞死亡; 当培养至 80 小时后, CKLF1 和 CKLF2 组即有大量的中等大小、形态相似的圆形细胞出现, CKLF3 组该种形态的细胞很少, 细胞形态和数量与 pcDI 相比, 没有显著性区别。如图 8A 和图 8B 所示。

实施例 8: CKLF1 对人低密度骨髓细胞生长的作用

8.1 促增殖作用

用 Ficoll-Hypaque 分层液分离健康人低密度骨髓细胞, 将分离纯化

后的骨髓细胞调整为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ ，铺到 96 孔板中。阴性对照组为 $10\mu\text{l}$ 常培养 72 小时的 COS-7 细胞上清，阳性对照组为 $10\mu\text{l}$ 终浓度 $100\text{ng}/\text{ml}$ 的 rhGM-CSF，实验组加 $10\mu\text{l}$ 相应的原浓度转染上清，MTT 法测定光吸收值的操作同上。

5 结果

如图 9 所示：终浓度 10 倍稀释的 CKLF1 转染上清，能明显促进人低密度骨髓细胞的增殖，增殖程度与终浓度 $100\text{ng}/\text{ml}$ 的 GM-CSF 相似。

8.2 促进集落形成

正常人外周血低密度骨髓细胞经 Ficoll-Hypaque ($1,077\text{g}/\text{cm}^3$) 分离
10 纯化后，调整细胞浓度为 5×10^4 个/ ml ，接种到 0.3% 软琼脂中。对照组加相同体积 1640 培养基，实验组加终浓度为 $100\text{ng}/\text{ml}$ 的 rhGM-CSF 和不同稀释度的 pcDI -CKLF1 转染上清及 pcDI 转染上清。37°C，5% CO_2 培养两星期，统计不同组的集落数，多于 50 细胞的为一个集落。

结果

15 如表 1 所示：CKLF1 正义转染上清本身能明显促进人低密度骨髓细胞集落的形成，与终浓度 $100\text{ng}/\text{ml}$ 的 GM-CSF 有明显的协同作用。CKLF1 刺激的骨髓细胞中含有巨型细胞，如图 10 所示，且细胞比单纯 GM-CSF 刺激的细胞存活时间更长。

表 1: CKLF1 转染上清对人低密度骨髓细胞粒单系集落形成的促进作用

Concentration	GM-CSF	pcDI	CKLF1	GM-CSF+pcDI	GM-CSF+CKLF1
10-1	22±3	11±2	28±3	21±2	36±3
15-1		11±1	16±2	23±1	28±2
30-1		10±3	10±2	20±2	22±2

实施例 9: CKLF1 及其变异体在正常细胞和肿瘤细胞的表达。

为分析 CKLF1 在各种胚胎组织, 成人组织及肿瘤组织的表达水平和剪切形式, 以 Clontech 公司 Multiple Tissue cDNA Panels 试剂盒提供的单链 cDNA 文库作模板, 利用 CKLF1 编码区特异性引物 (同构建 pcDI 载体的引物), 进行 PCR 扩增, 扩增条件同前。

结果

CKLF1 及其变异体在正常成人组织中表达水平低或不表达 (图 11 A 和 B), 尤其在胰腺和前列腺中几乎检测不到; CKLF1 和 CKLF2 在多种胚胎组织和肿瘤组织如乳腺癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌和前列腺癌中高表达 (图 11 C 和 11D), 但 CKLF3 和 CKLF4 的表达水平较低。上述结果提示 CKLF1 可能与胚胎发育及肿瘤的发生有密切关系。

实施例 10: CKLF1 基因在哺乳动物体内的生物活性研究

选择 4-6 周龄的 BABL/c 小鼠 (购自中国医学科学院遗传所) 为实验动物。利用 Qiagen 公司的质粒纯化系统纯化真核表达质粒 pcDI-CKLF1, 应用基因直接注射的方法将 pcDI-CKLF1 注射至小鼠肌肉组织及皮下组织 (100 μ g/只)。注射后第 10 天、第 30 天分别采取注射局部的小鼠肌肉组织及皮下组织, 冰冻切片, 并作苏木精-伊红 (HE)、孚尔根 (Feulgen)、酸性磷酸酶 (AcP) 酶染色分析, 高倍镜观察。通过组织学、免疫组织化学、酶学的方法观察 pcDI-CKLF1 表达产物在注射组织局部的生物学效应。

结果

pcDI-CKLF1 表达产物具有: (1) 趋化炎症细胞至注射局部组织的作用

用；(2) 促进骨骼肌细胞增殖及分化的作用；(3) 促进毛囊角质细胞增殖及分化的作用。

结果

AcP 染色 (图 12A 和 12B) 和 HE 染色 (图 13A 和 13B) 的结果显示:

5 注射 0.9%生理盐水及空质粒的对照组骨骼肌细胞(实验对照组)与小鼠正常骨骼肌细胞的形态结构相比,形态结构未见明显改变.而注 pcDI-CKLF1(实验组)的骨骼肌局部组织出现细胞核增多,细胞核居中,并呈串装排列现象,同时伴随着单核吞噬细胞等细胞的浸润现象.第 10, 20, 30 天非常明显,尤以第 10 天最为显著.

10 Feulgen 反应显示脱氧核糖核酸(DNA)结果: 经 Leica Q500MC 图象分析仪分析,与实验对照组相比,实验组中骨骼肌组织的 DNA 着色反应的平均光密度值(MOD)明显增高(参见表 2),提示骨骼肌组织内细胞核显著增多.其中肌注+针刺组中胞核增多较对照更为明显(t 检验 $p < 0.01$).

15 表 2 注射局部骨骼肌组织 Feulgen 氏反应结果分析($\bar{x} \pm s$, 单位 MOD)

质粒	PcDI-CKLF1 (实验组)		PcDI (对照组)	
组别	A	B	A	B
细胞核个数	514.33 ± 32.18	666.7 ± 42.51	67.18 ± 11.21	63.43 ± 14.34
细胞核光密度值	0.134 ± 0.017	0.118 ± 0.023	0.098 ± 0.008	0.094 ± 0.001

注: A 为布比卡因+肌注, B 为肌注+针刺。

权利要求书

- 1、一个趋化素样因子 CKLF1 及具有相同功能的多肽片段、变
体或衍生物，其中所述趋化素样因子具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基
5 酸序列。
- 2、根据权利要求 1 的趋化素样因子，其中所述趋化素样因子由
菌种 CGMCC No. 0392 携带的质粒编码产生。
- 3、趋化素样因子 CKLF1 的变体，其中 CKLF1 变体具有 SEQ ID
NO: 4、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。
- 10 4、编码趋化素样因子 CKLF1 的分离的核酸序列，或其等位基因
变体，或在严格条件下与之杂交的核酸片段。
- 5、根据权利要求 4 的核酸序列，其中所述核酸序列如 SEQ ID NO:
1 所示。
- 6、根据权利要求 4 或 5 的核酸序列，其中所述的核酸是基因组
15 DNA。
- 7、根据权利要求 4 或 5 的核酸序列，其中所述的核酸是 cDNA。
- 8、根据权利要求 4 或 5 的核酸序列，其中所述的核酸是 RNA。
- 9、包含权利要求 4-8 任意一项所述核酸序列的载体。
- 10、包含权利要求 9 所述载体的宿主细胞，其中宿主细胞可以
20 由权利要求 9 的载体经转化、转染或转导的方法得到。
- 11、一种生产权利要求 1 所述趋化素样因子的方法，方法包括
用基因工程的方法将编码 CKLF1 的质粒导入宿主细胞，并在合适的
条件下培养宿主细胞，并从细胞裂解物或培养基中回收趋化素样因
子。
- 25 12、一种药物组合物，其特征在于药物组合物包括有效剂量的

趋化素样因子 CKLF1 或其活性成分, 以及一或多种药学上可接受的载体或赋形剂。

13、一种单克隆或多克隆抗体, 其特征在于所述抗体可以特异性地与 CKLF1 结合。

5 14、一种拮抗剂, 其特征在于所述拮抗剂可以抑制或封闭 CKLF1 的生物活性。

15、一种体外诊断方法, 该方法包括检测样品中权利要求 1 的 CKLF1 含量或检测权利要求 2 的核酸序列。

10 16、根据权利要求 1 的 CKLF1 或根据权利要求 2 的核酸序列在制备提高 DNA 疫苗或 DNA 药物疗效的免疫佐剂中的应用。

17、根据权利要求 1 的 CKLF1 或根据权利要求 2 的核酸序列在制备治疗炎症反应、退行性病变、原发性肿瘤及造血功能障碍等疾病的药物中的应用。

15 18、根据权利要求 14 的应用, 其中所述的炎症反应是类风湿性关节炎等自身免疫病、变态反应及异常增生性疾病。

19、根据权利要求 14 的用途, 其中所述的退行性病变是肌肉萎缩、肌肉病变、脱发等病症。

20、根据权利要求 14 的用途, 其中所述的肿瘤选自由乳腺癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌和前列腺癌组成的组。

1/18

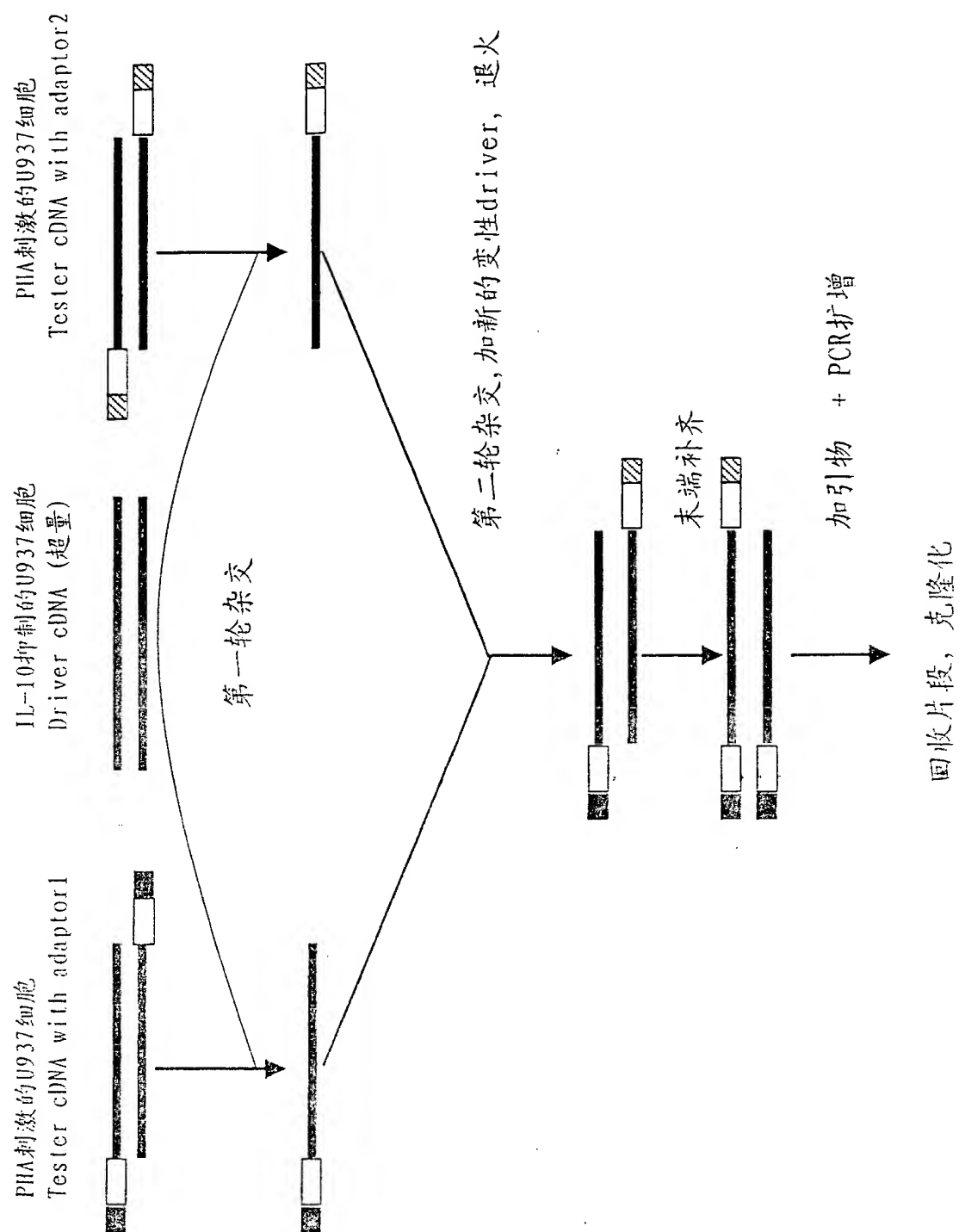
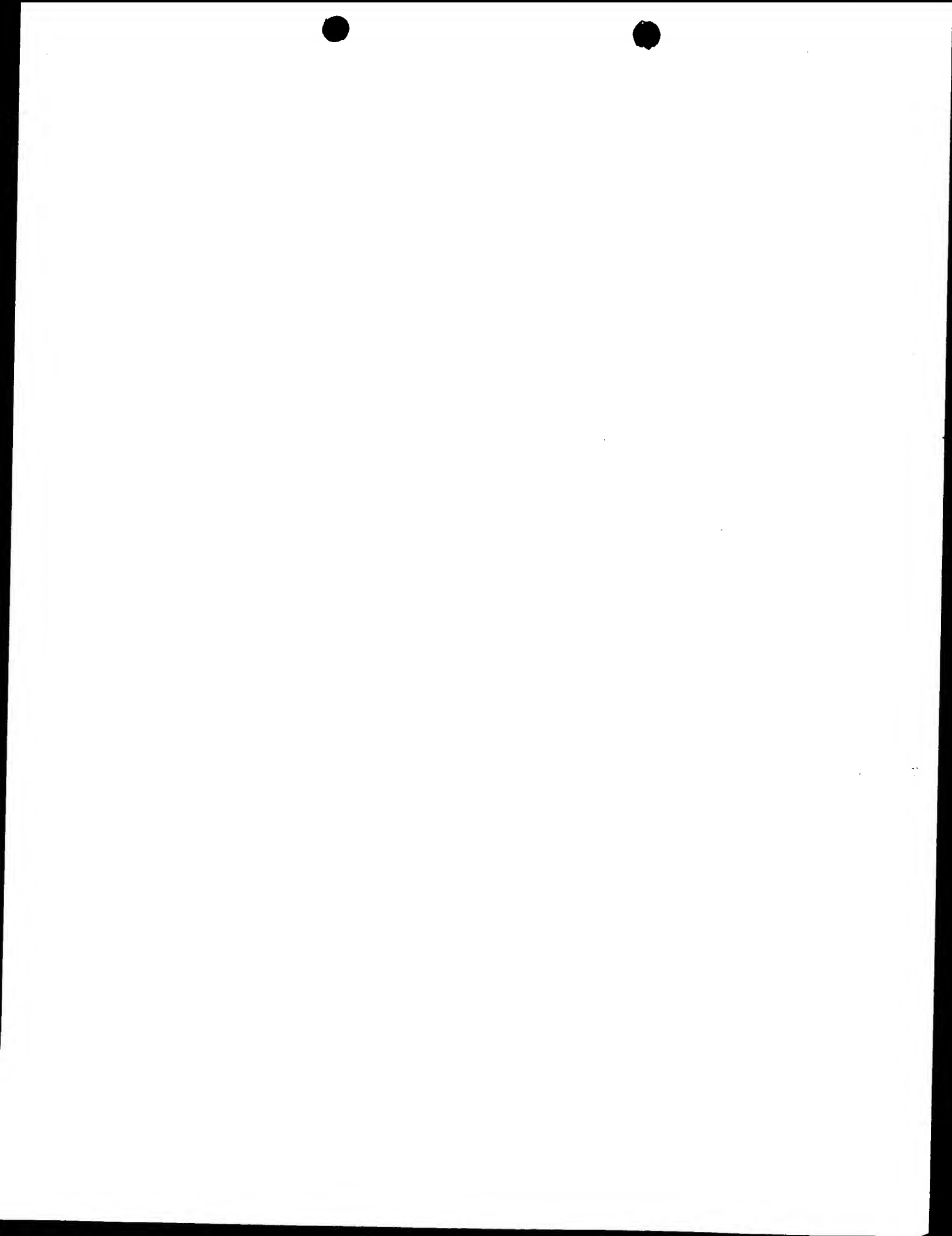


图 1



2/18

26 79 112

CKLFF2, 152AA

CKLFF1, 99AA

CKLFF4, 120AA

CKLFF3, 67AA

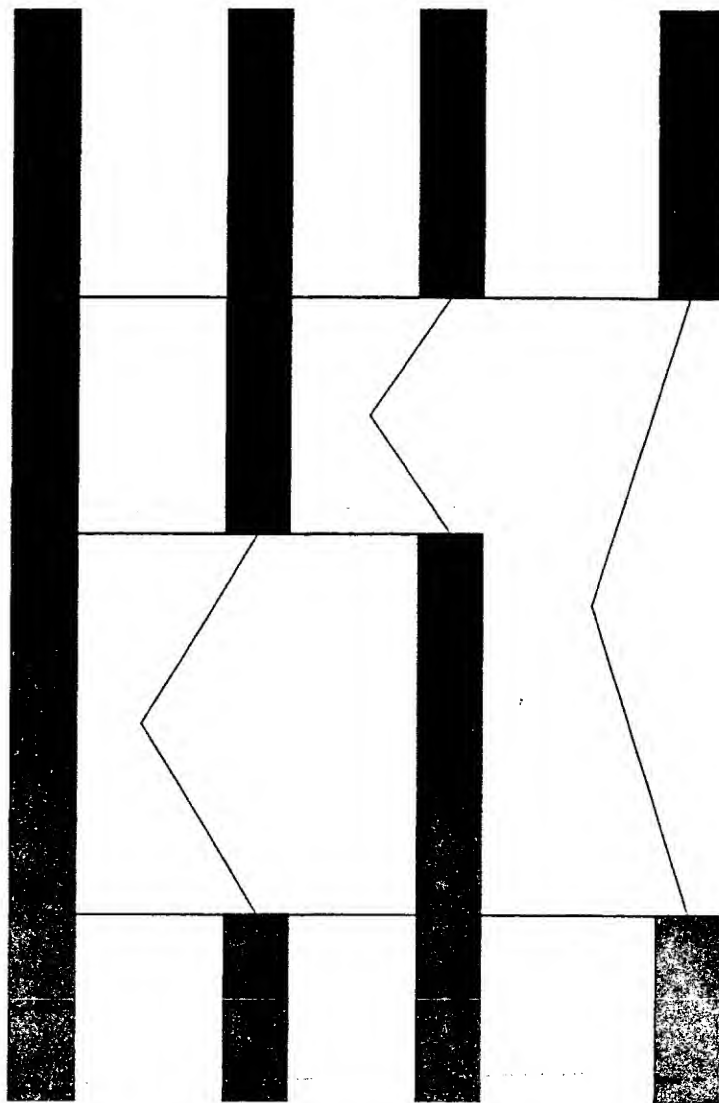
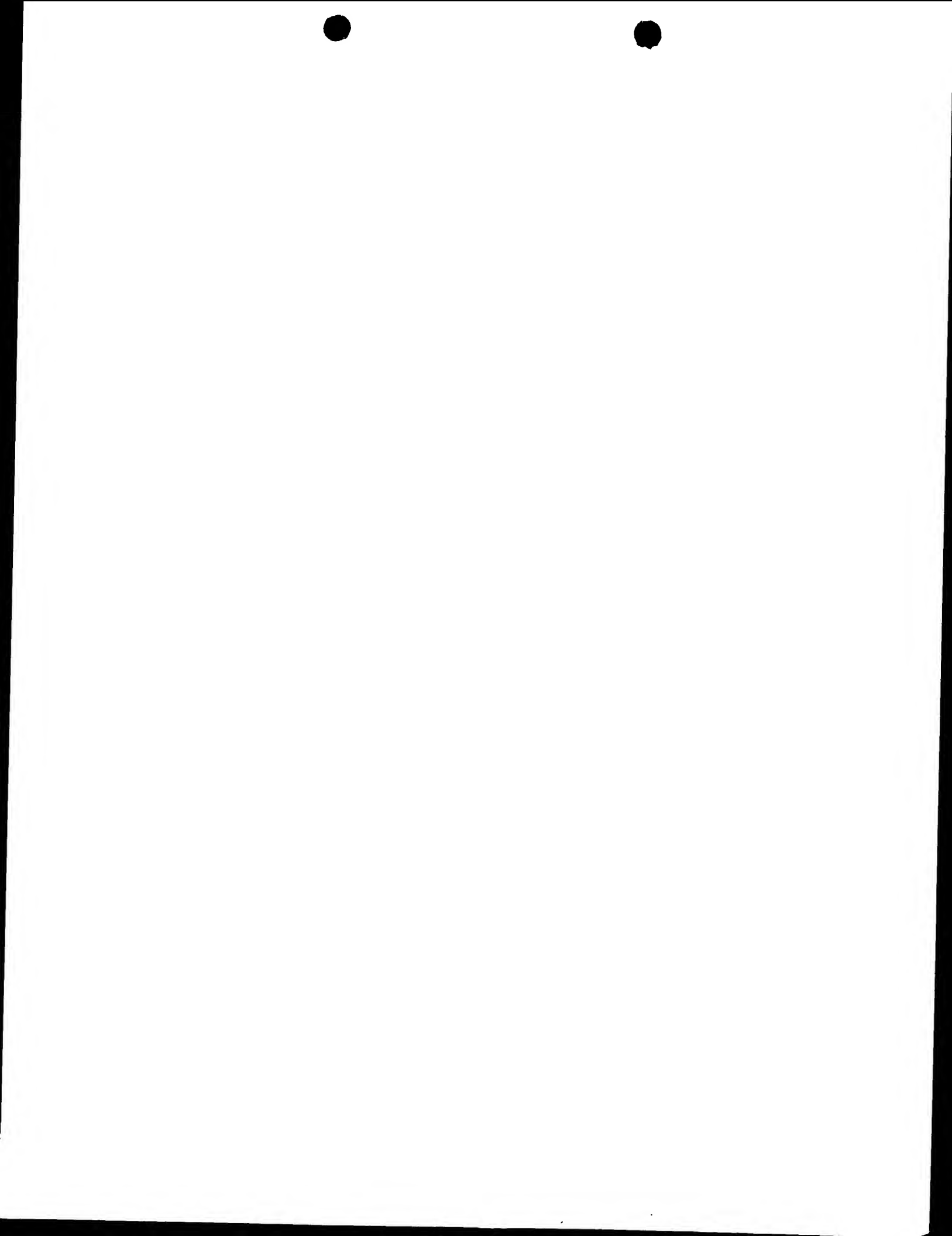


图2



3/18

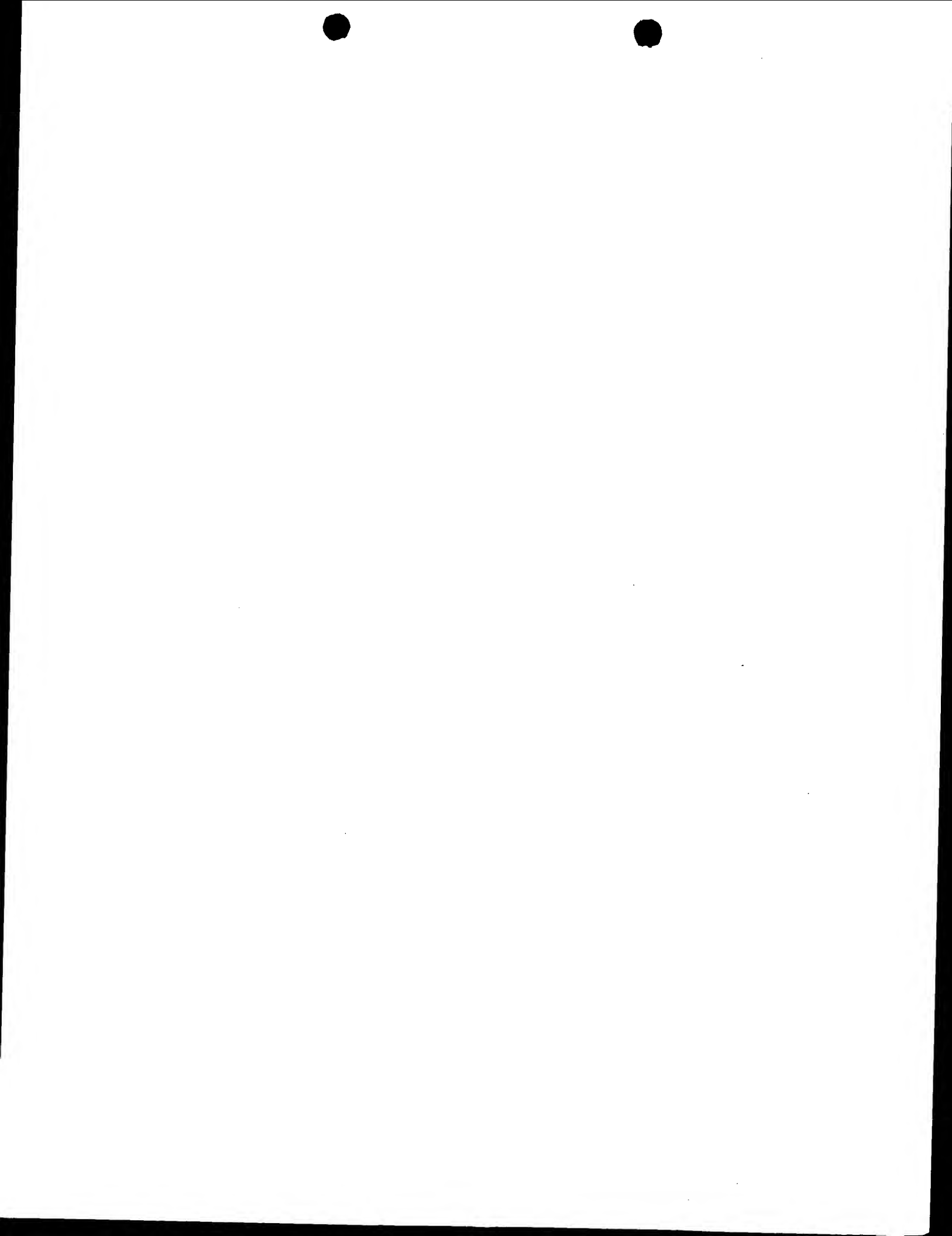
1 2 3 4 5

1.5kb

0.5kb

1. 人G3PDH (左为tester总RNA, 右为driver总RNA, 下面相同);
2. U1; 3. CKLF-1; 4. U14; 5. U24

图3



4/18



图4

5/18

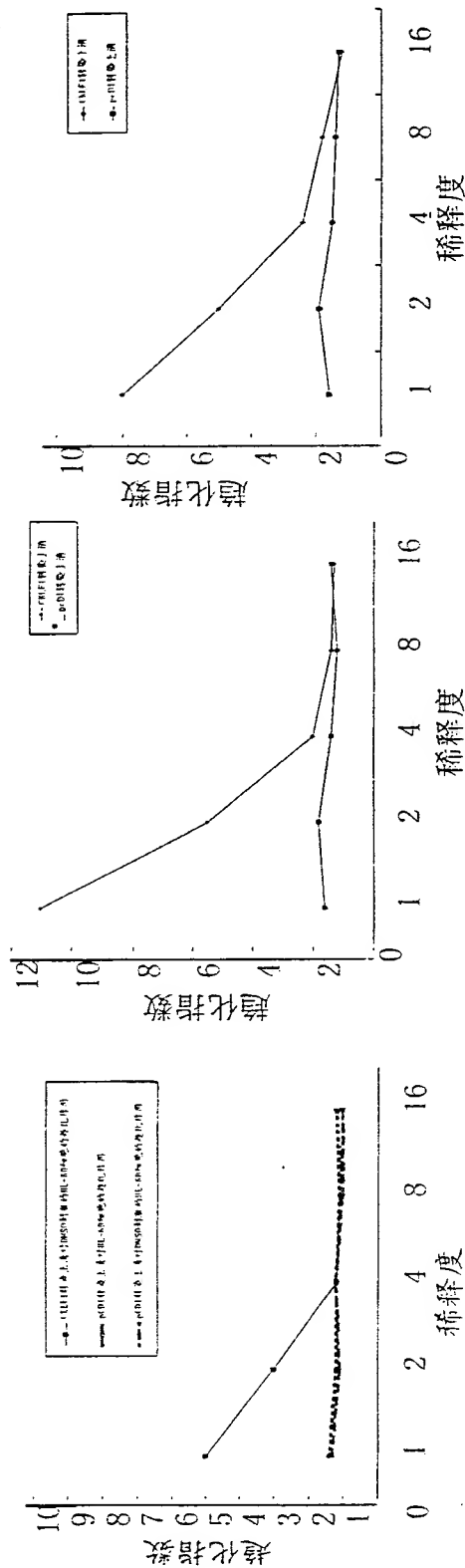
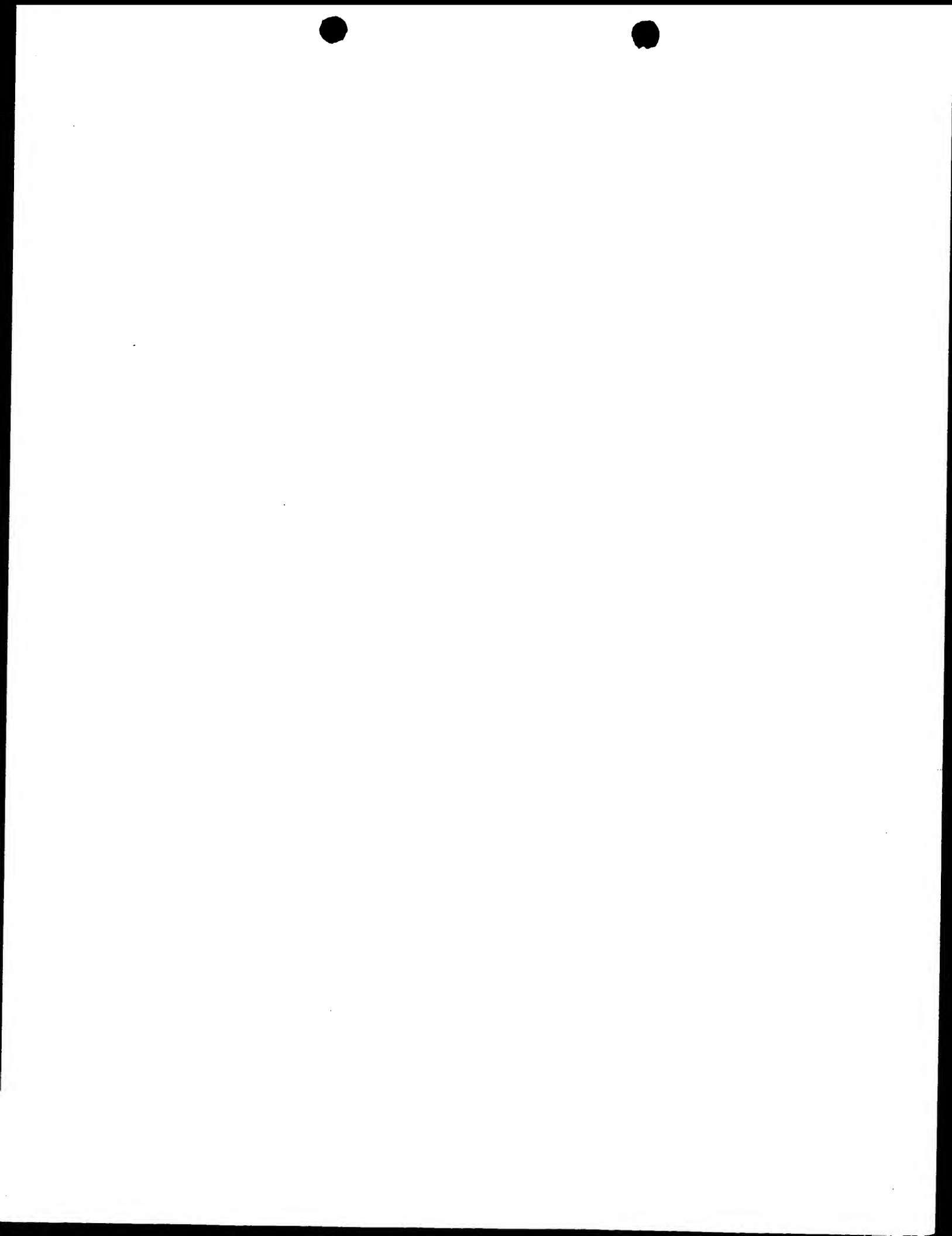


图5A

图5B

图5C



6/18

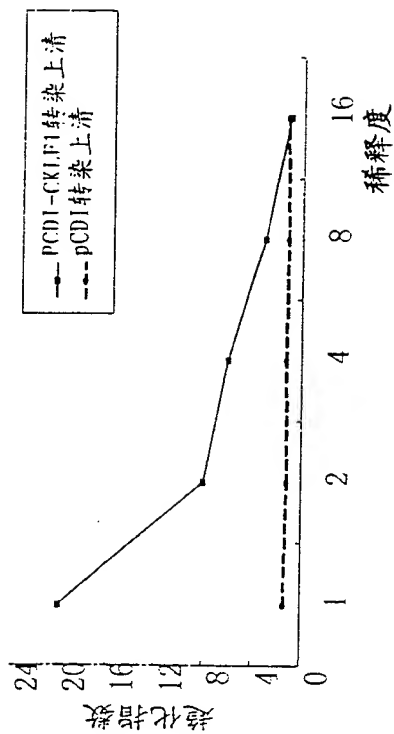


图5E

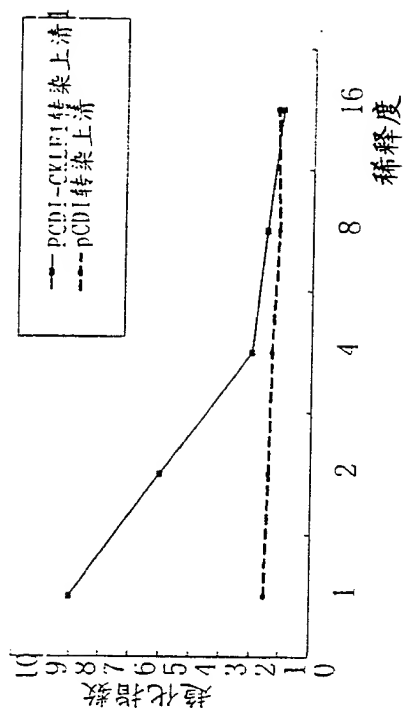


图5G

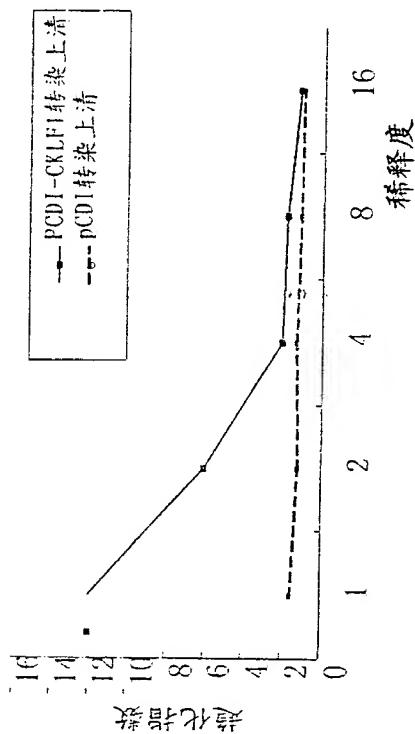


图5D

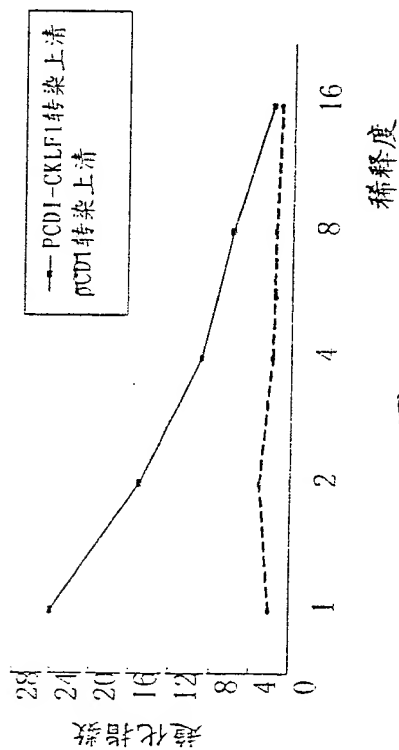


图5F

7/18

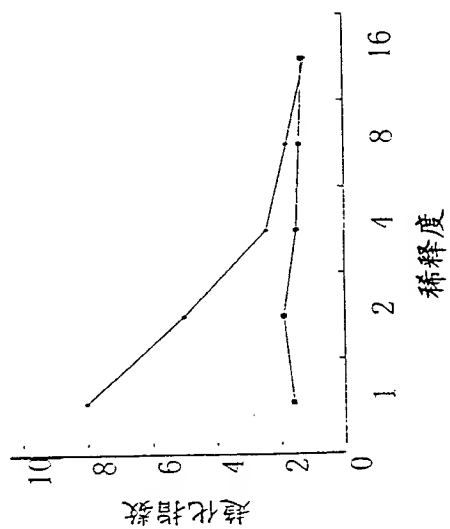


图 5I

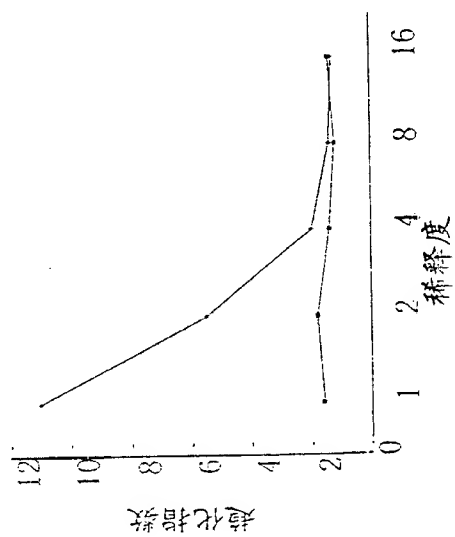


图 5H

8/18

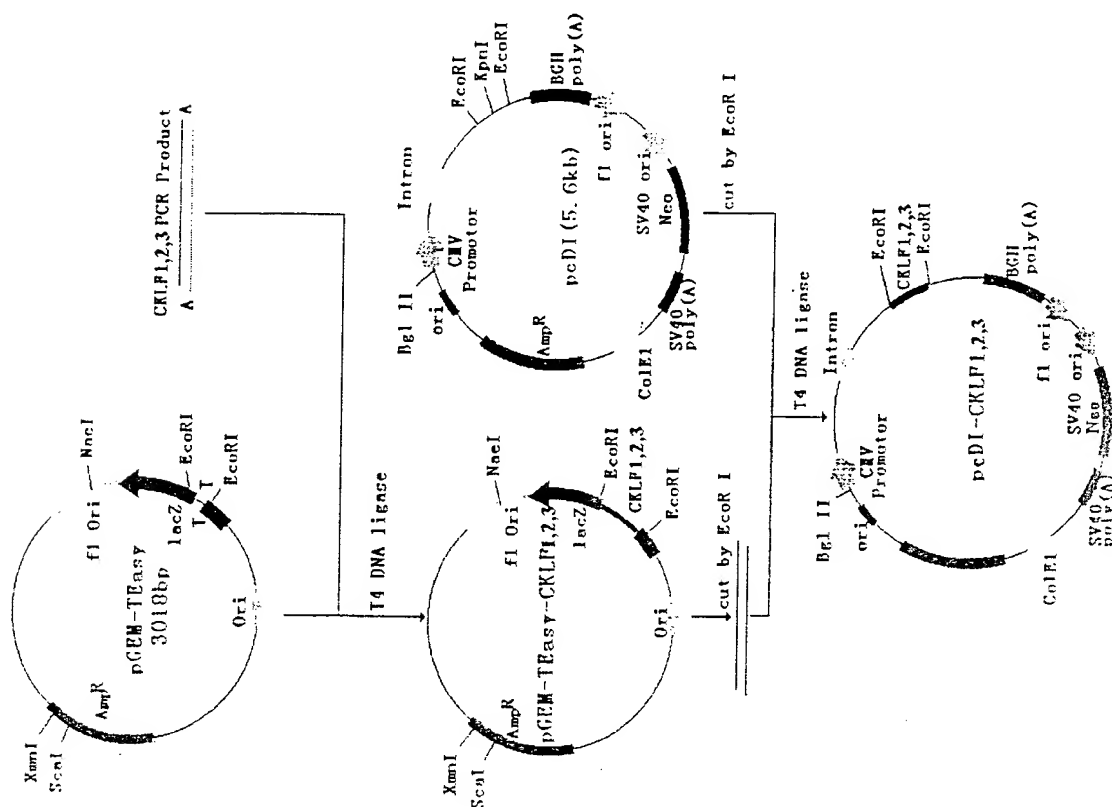


图6

9/18

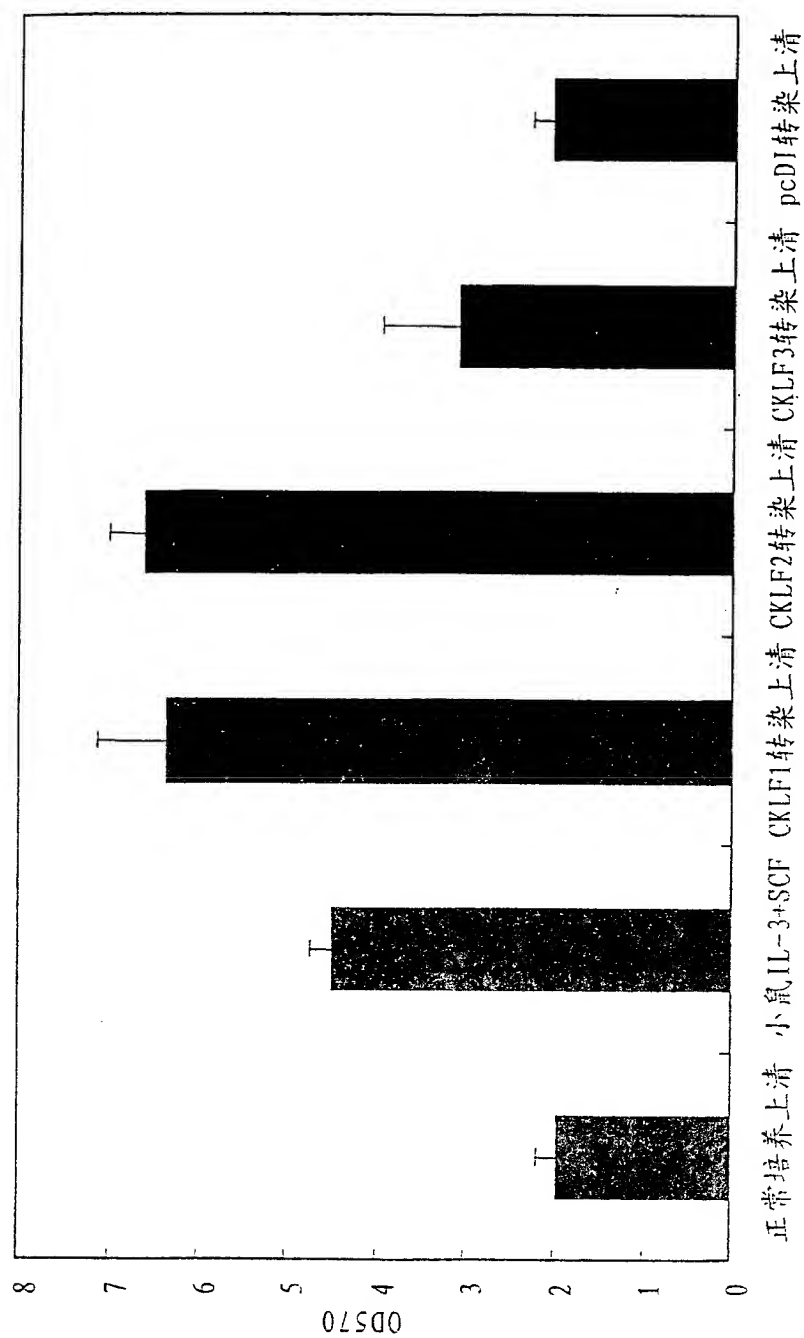


图7

10/18

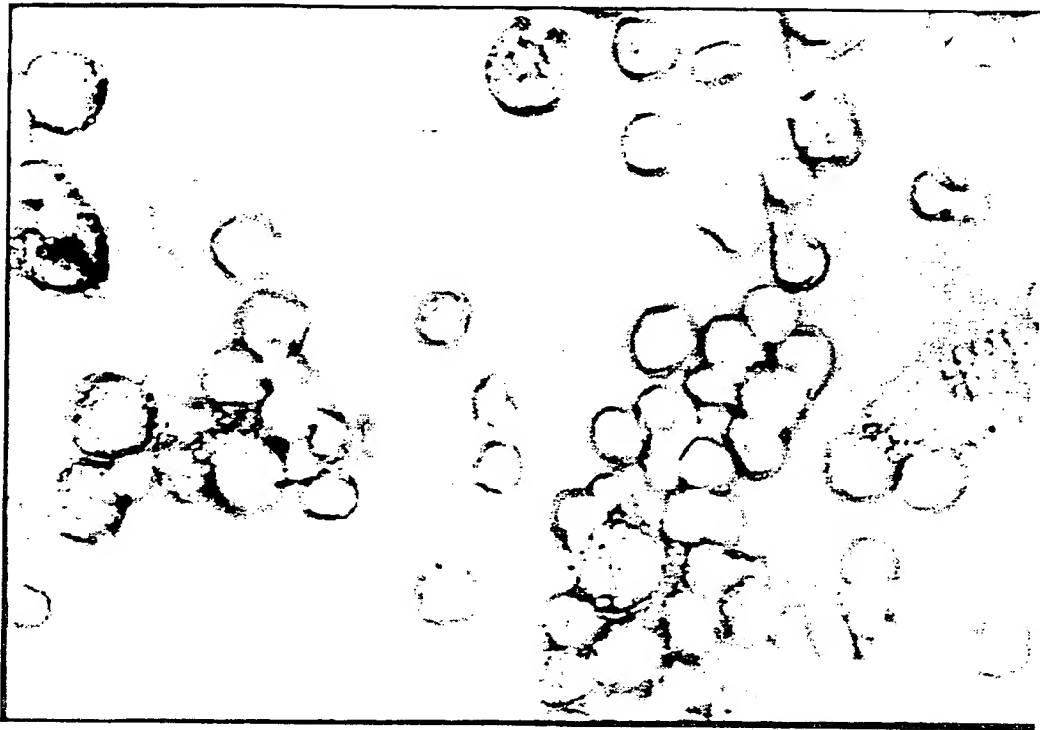


图 8B

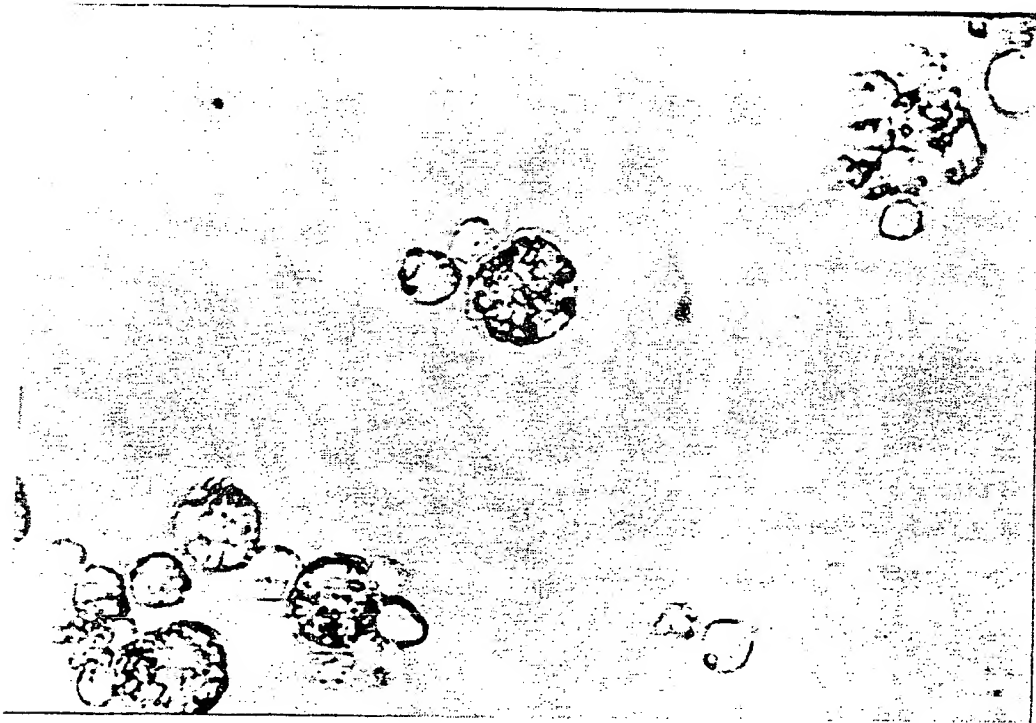


图 8A

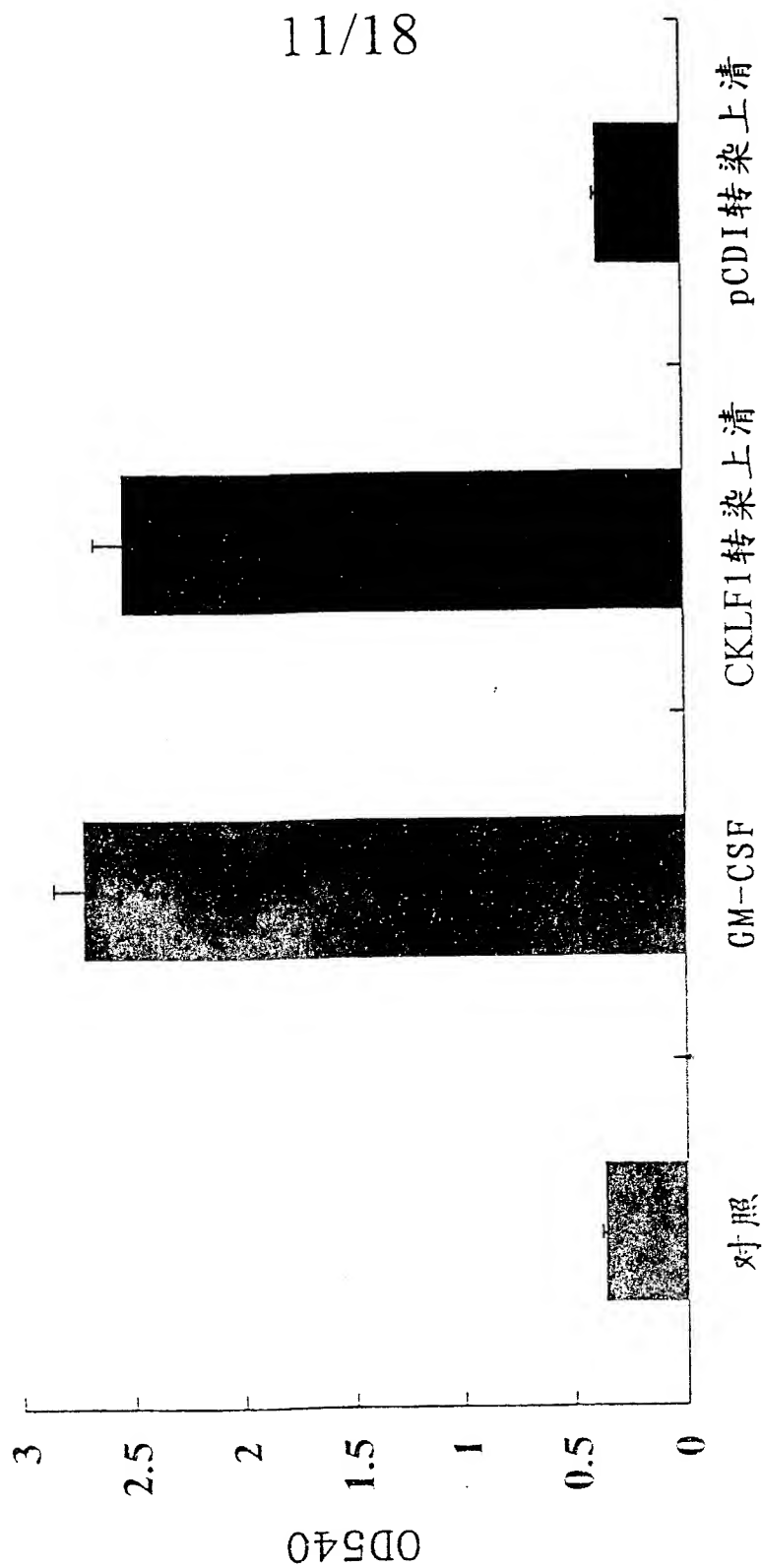


图9

12/18

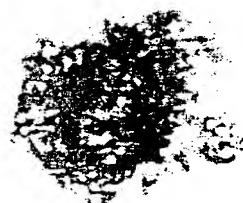
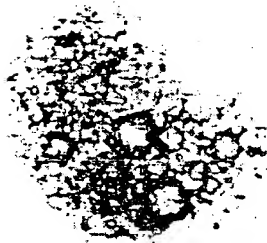
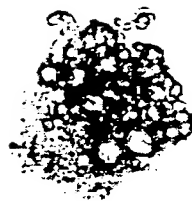
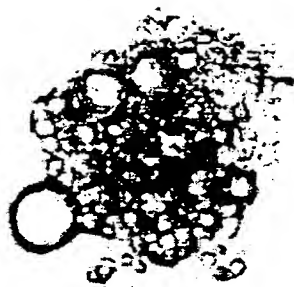
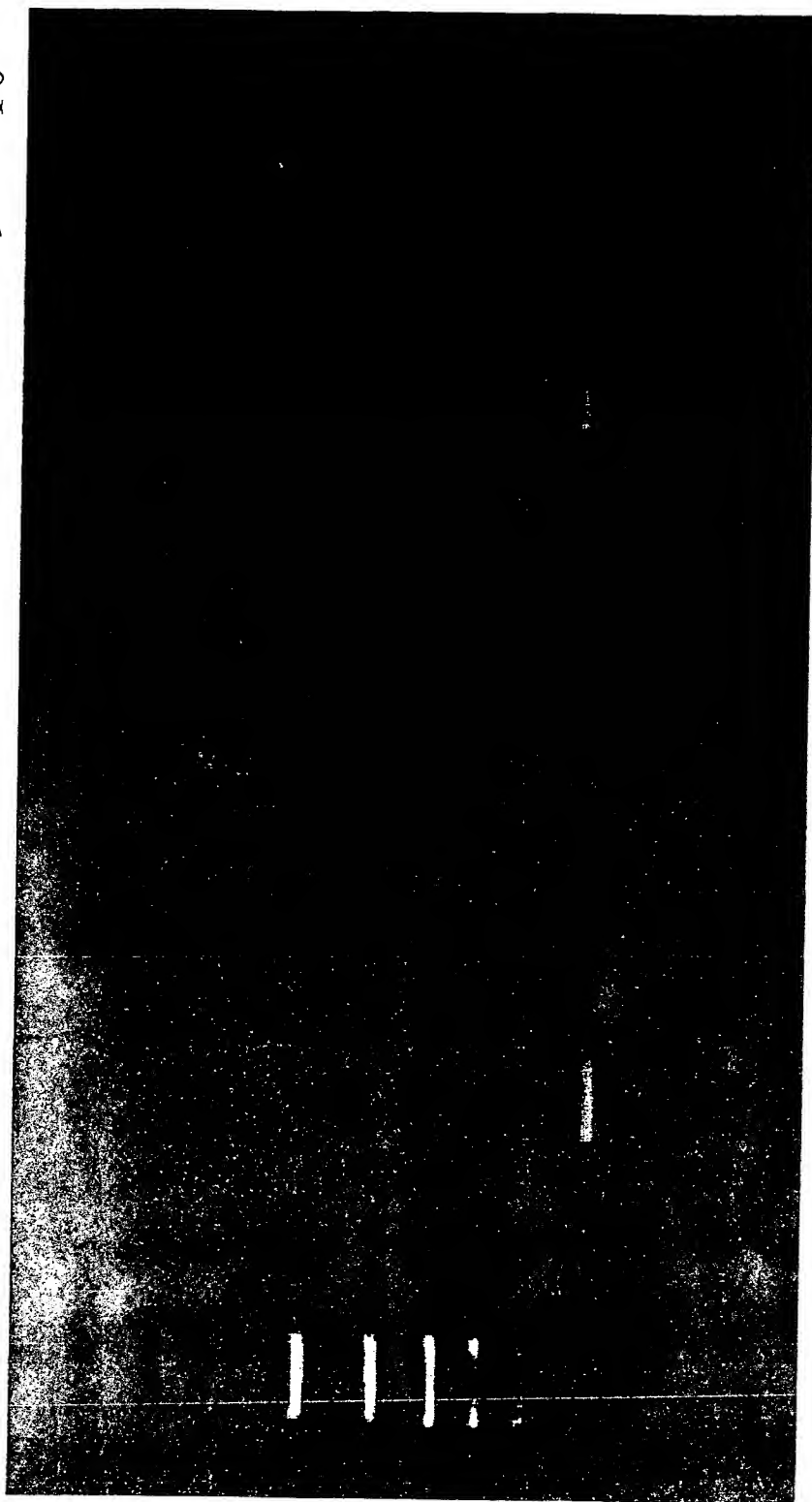


图10

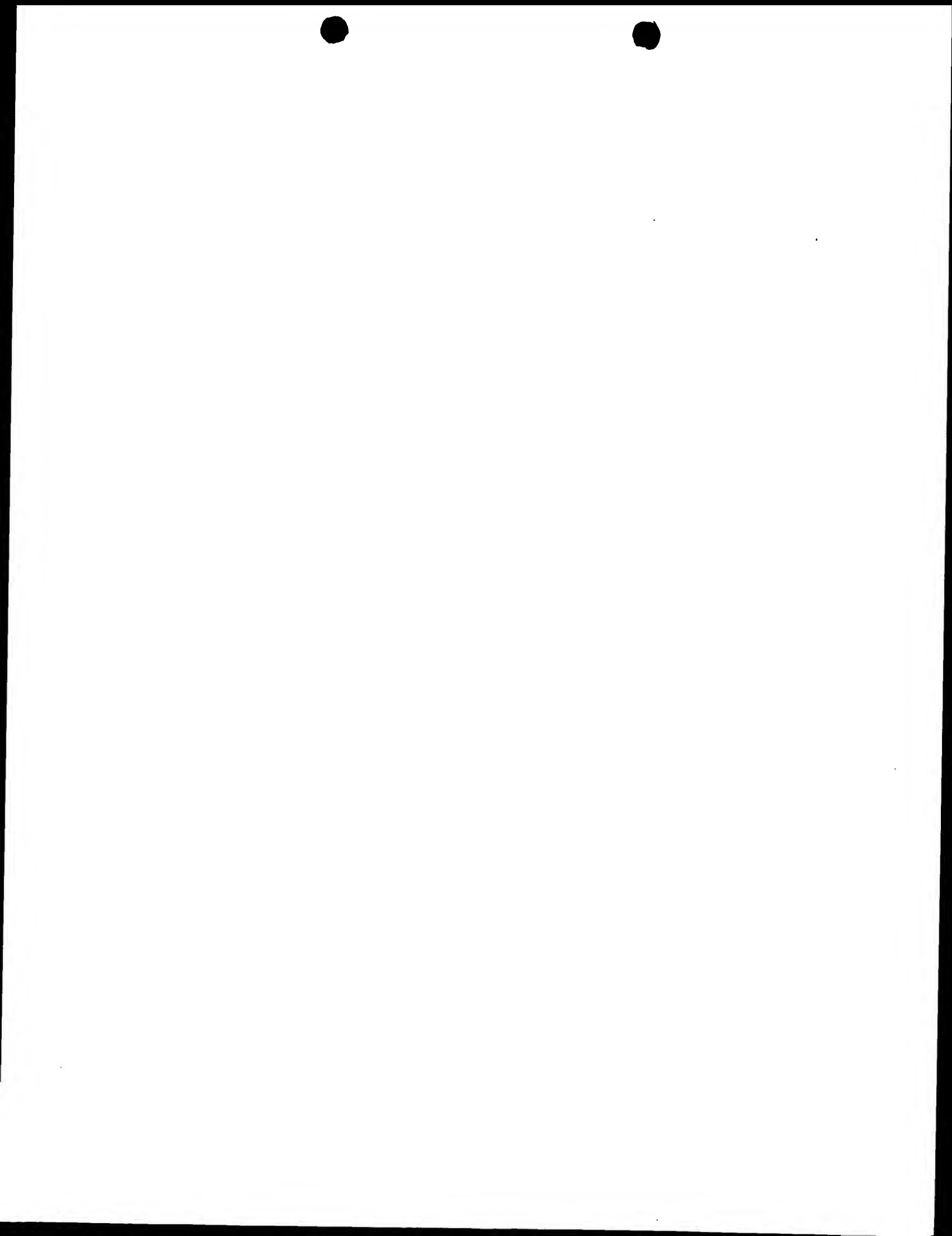
13/18

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



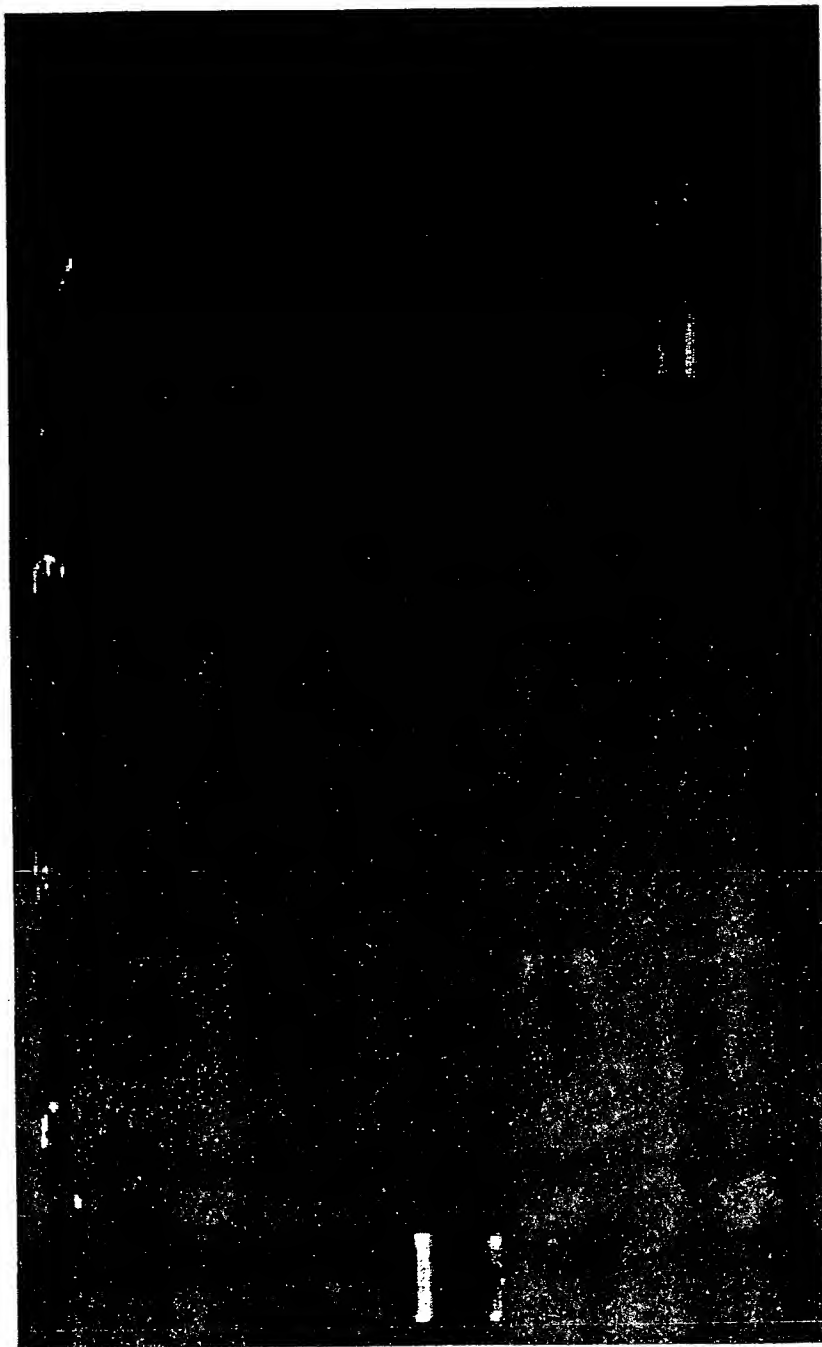
1. PCR marker, 2. 阴性对照, 3. 脑, 4. 结肠, 5. 心脏,
6. 肾脏, 7. 白细胞, 8. 肝脏, 9. 肺脏, 10. 卵巢

图11A



14/18

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

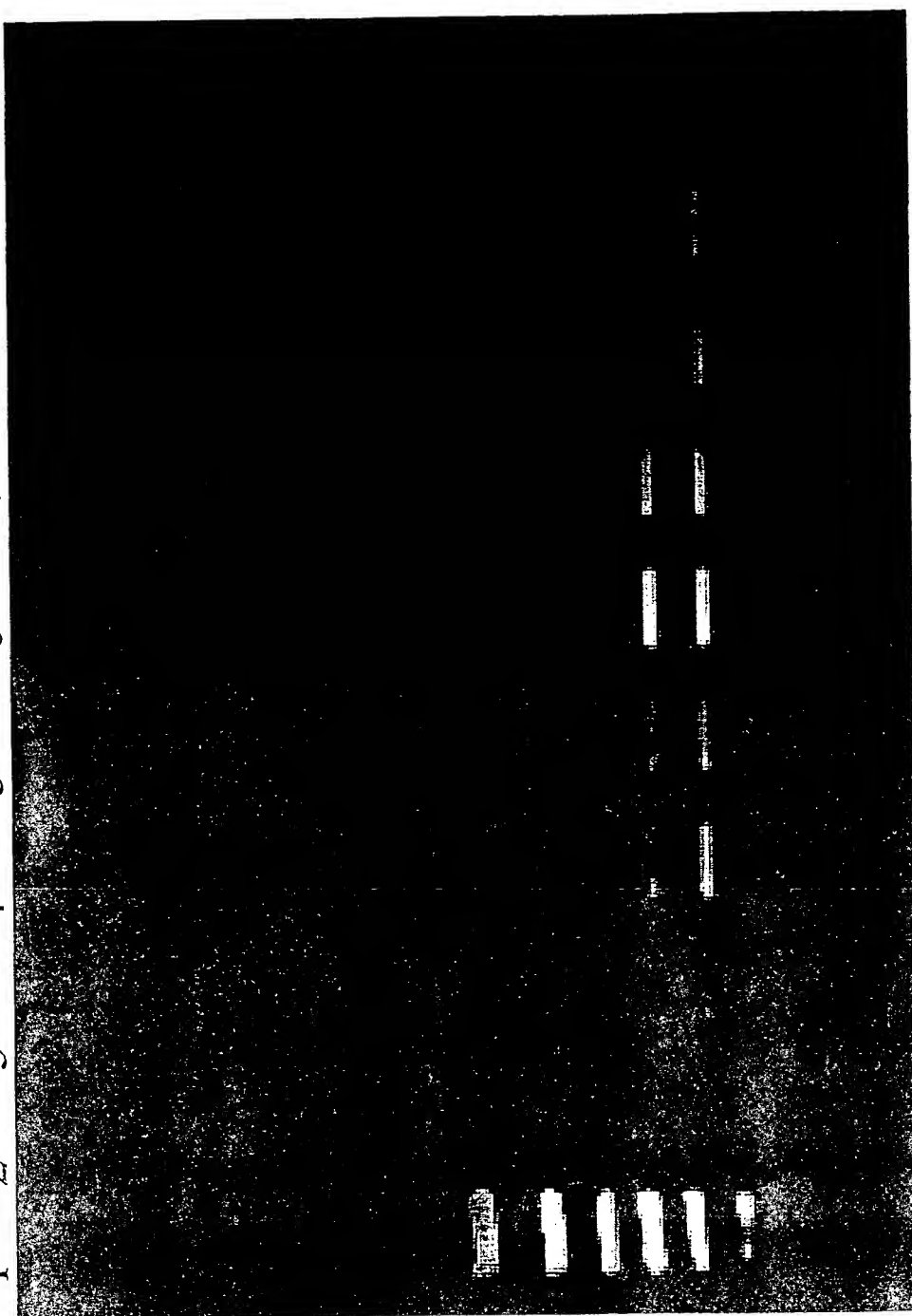


1. PCR marker, 2. 阴性对照, 3. 胰腺, 4. 胎盘, 5. 前列腺,
6. 肌肉, 7. 小肠, 8. 脾脏, 9. 睾丸, 10. 胸腺

图11B

15/18

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

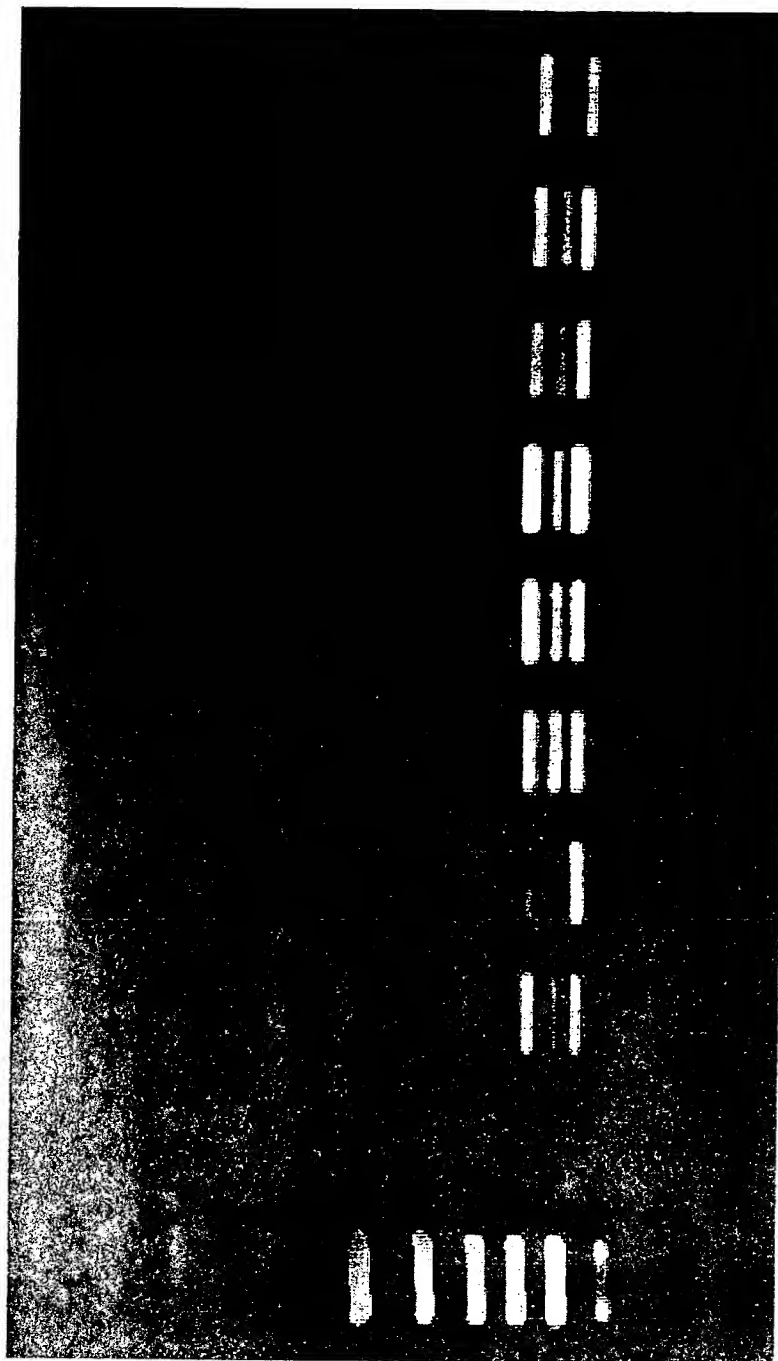


1. PCR marker, 2. 阴性对照, 3. 胎脑, 4. 胎心, 5. 胎肾,
6. 胎肝, 7. 胎肺, 8. 胎儿肌肉, 9. 胎脾, 10. 胎儿胸腺

图11C

16/18

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



1. PCR marker, 2. 阴性对照, 3. 乳腺癌, 4. 结肠癌 (CX-1)

5. 结肠癌 (G1-112), 6. 肺癌 (G1-117), 7. 肺癌 (LX-1)

8. 卵巢癌, 9. 胰腺癌, 10. 前列腺癌

图11D

17/18

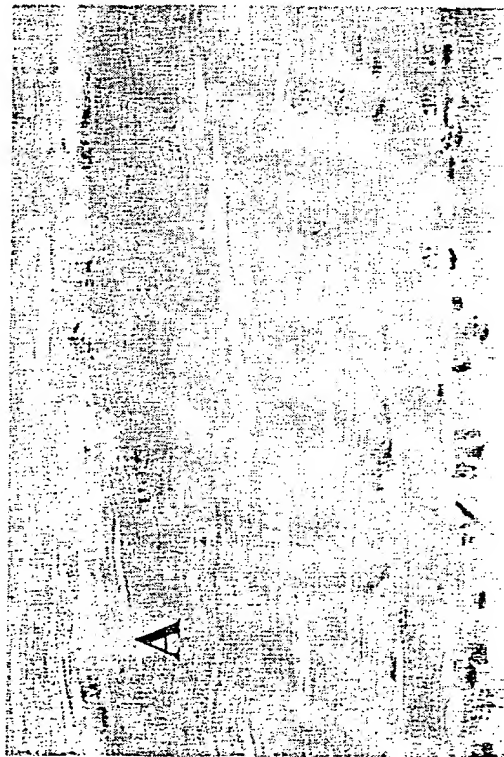
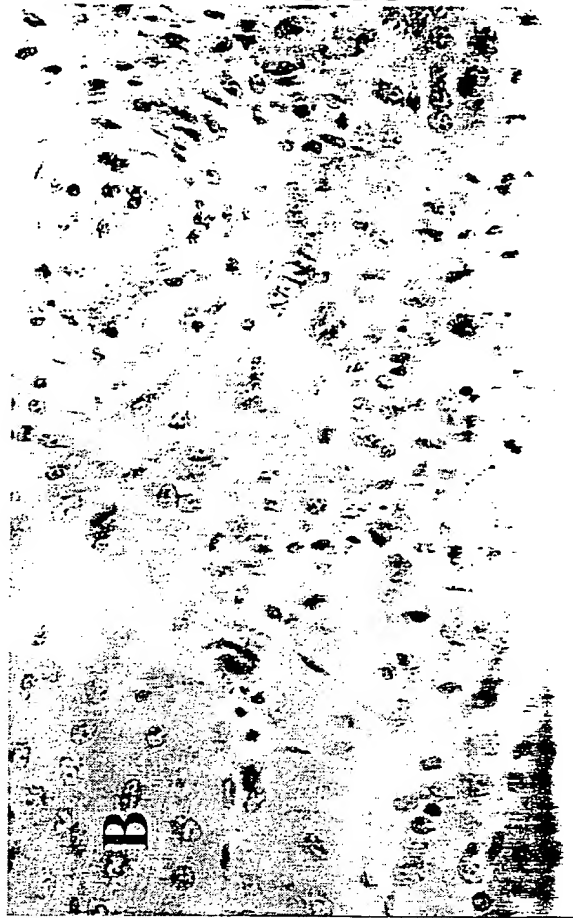


图12B



图12A

18/18



序列表

(1)、一般信息

(i) 申请人: 北京医科大学、北京北医联合生物工程公司

(ii) 发明名称: 具有免疫细胞趋化作用和造血刺激作用的趋化素样因子

(iii) 序列数: 8

(iv) 通讯地址:

(A) 联系人: 马大龙

(B) 街道: 海淀区学院路 38 号

(C) 城市: 北京

(D) 国家: 中华人民共和国

(E) 邮编: 100083

(v) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: 3.5 英寸软盘

(B) 计算机: 奔腾 166MMX

(C) 操作系统: WINDOWS 95

(D) 软件: WORD 97

(vi) 电讯信息:

(A) 电话: 86-10-62091149

(B) 电传: 86-10-62091149

(1) SEQ ID NO: 1 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 534 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 1

	3	9	15	21	27	33	39	45
1	GTT	CCC	AAT	CTG	AAG	TGA	AGC	CGA
46	GGC	GGT	GCT	CCG	CCG	CGG	TGG	CGG
91	TAC	TCA	GGC	AGC	CAG	CTG	AGA	AGA
136	TGG	GTC	TGC	AGA	CGC	GAT	GGA	TAA
181	TCG	CCC	CTT	CTG	CTT	CAG	TGT	GAA
226	GCT	GGA	TAT	TAT	CAA	CTC	ACT	GGT
271	CGT	ATC	TGT	GTT	GGC	ACT	GAT	ACC
316	TGG	TGG	AGG	GGT	GTT	TGC	ACT	TGT
361	CGA	CGG	GGC	CCT	TAT	TTA	CCG	GAA
406	TCC	TTA	CCA	GAA	AAA	GCC	TGT	GCA
451	ATT	TTA	TAT	TAC	TTT	TTA	GTT	TGA
496	CTG	TAT	TCT	TCC	AAA	AAA	AAA	AAA

(2) SEQ ID NO: 2 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 99 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 2

	5	10	15
1	Met	Asp	Asn
16	Ser	Val	Lys
31	Ser	Leu	Val
46	Leu	Ile	Pro
61	Ala	Leu	Val
76	Tyr	Arg	Lys
91	Pro	Val	His

1 Met Asp Asn Val Gln Pro Lys Ile Lys His Arg Pro Phe Cys Phe
 16 Ser Val Lys Gly His Val Lys Met Leu Arg Leu Asp Ile Ile Asn
 31 Ser Leu Val Thr Thr Val Phe Met Leu Ile Val Ser Val Leu Ala
 46 Leu Ile Pro Glu Thr Thr Thr Leu Thr Val Gly Gly Gly Val Phe
 61 Ala Leu Val Thr Ala Val Cys Cys Leu Ala Asp Gly Ala Leu Ile
 76 Tyr Arg Lys Leu Leu Phe Asn Pro Ser Gly Pro Tyr Gln Lys Lys
 91 Pro Val His Glu Lys Lys Glu Val Leu

(1) SEQ ID NO: 3 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 459 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 3

	3	9	15	21	27	33	39	45
1	ATG	GAT	AAC	GTG	CAG	CCG	AAA	ATA
46	AGT	GTG	AAA	GGC	CAC	GTG	AAG	ATG
91	ACA	TCT	ATG	ACC	TTT	TTT	ATC	ATC
136	ATT	GTT	ATC	ACT	GGA	TTT	GAA	GTC
181	CTT	TTA	TAT	GTA	CTC	AGA	CTT	GAT
226	TGG	CCT	TTG	CTT	GAT	ATT	ATC	AAC
271	ATG	CTC	ATC	GTA	TCT	GTG	TTG	GCA
316	TTG	ACA	GTT	GGT	GGA	GGG	GTG	TTT
361	TGT	CTT	GCC	GAC	GGG	GCC	CTT	ATT
406	CCC	AGC	GGT	CCT	TAC	CAG	AAA	AAG
451	GTT	TTG	TAA					

(2) SEQ ID NO: 4 的信息

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 152 个氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 4

	5	10	15
1	Met	Asp	Asn
16	Ser	Val	Lys
31	Thr	Ser	Met
46	Ile	Val	Ile
61	Leu	Leu	Tyr
76	Trp	Pro	Leu
91	Met	Leu	Ile
106	Leu	Thr	Val
121	Cys	Leu	Ala
136	Pro	Ser	Gly
151	Val	Leu	

(1) SEQ ID NO: 5 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 204 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 5

	3	9	15	21	27	33	39	45
1	ATG	GAT	AAC	GTG	CAG	CCG	AAA	ATA
46	AGT	GTG	AAA	GGC	CAC	GTG	AAG	ATG
91	GTG	ACA	GCA	GTA	TGC	TGT	CTT	GCC
136	AAG	CTT	CTG	TTC	AAT	CCC	AGC	GGT
181	CAT	GAA	AAA	AAA	GAA	GTT	TTG	TAA

(2) SEQ ID NO: 6 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 67 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 6

	5	10	15
1	Met	Asp	Asn
16	Ser	Val	Lys
31	Val	Thr	Ala
46	Lys	Leu	Leu
61	His	Glu	Lys

Val Gln Pro Lys Ile Lys His Arg Pro Phe Cys Phe
 Gly His Val Lys Met Leu Arg Leu Val Phe Ala Leu
 Val Cys Cys Leu Ala Asp Gly Ala Leu Ile Tyr Arg
 Phe Asn Pro Ser Gly Pro Tyr Gln Lys Lys Pro Val
 Glu Val Leu

(1) SEQ ID NO: 7 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 363 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 7

	3	9	15	21	27	33	39	45							
1	ATG	GAT	AAC	GTG	CAG	CCG	AAA	ATA	AAA	CAT	CGC	CCC	TTC	TGC	TTC
46	AGT	GTG	AAA	GGC	CAC	GTG	AAG	ATG	CTG	CGG	CTG	GCA	CTA	ACT	GTG
91	ACA	TCT	ATG	ACC	TTT	TTT	ATC	ATC	GCA	CAA	GCC	CCT	GAA	CCA	TAT
136	ATT	GTT	ATC	ACT	GGA	TTT	GAA	GTC	ACC	GTT	ATC	TTA	TTT	TTC	ATA
181	CTT	TTA	TAT	GTA	CTC	AGA	CTT	GAT	CGA	TTA	ATG	AAG	TGG	TTA	TTT
226	TGG	CCT	TTG	CTT	GTG	TTT	GCA	CTT	GTG	ACA	GCA	GTA	TGC	TGT	CTT
271	GCC	GAC	GGG	GCC	CTT	ATT	TAC	CGG	AAG	CTT	CTG	TTC	AAT	CCC	AGC
316	GGT	CCT	TAC	CAG	AAA	AAG	CCT	GTG	CAT	GAA	AAA	AAA	GAA	GTT	TTG
361	TAA														

(2) SEQ ID NO: 8 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 120 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 序列描述: SEQ ID NO: 8

				5					10					15	
1	Met	Asp	Asn	Val	Gln	Pro	Lys	Ile	Lys	His	Arg	Pro	Phe	Cys	Phe
16	Ser	Val	Lys	Gly	His	Val	Lys	Met	Leu	Arg	Leu	Ala	Leu	Thr	Val
31	Thr	Ser	Met	Thr	Phe	Phe	Ile	Ile	Ala	Gln	Ala	Pro	Glu	Pro	Tyr
46	Ile	Val	Ile	Thr	Gly	Phe	Glu	Val	Thr	Val	Ile	Leu	Phe	Phe	Ile
61	Leu	Leu	Tyr	Val	Leu	Arg	Leu	Asp	Arg	Leu	Met	Lys	Trp	Leu	Phe
76	Trp	Pro	Leu	Leu	Val	Phe	Ala	Leu	Val	Thr	Ala	Val	Cys	Cys	Leu
91	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Ile	Tyr	Arg	Lys	Leu	Leu	Phe	Asn	Pro	Ser
106	Gly	Pro	Tyr	Gln	Lys	Lys	Pro	Val	His	Glu	Lys	Lys	Glu	Val	Leu

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN00/00026

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C07K14/52, C12N15/19, A61K38/19

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C07K, C12N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB, CNPAT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
A	WO-A-9613587 (09.05.1996) see claims 1-16	1-20
A	CN1202906 (23.12.1998) see claims 1-13	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 May 2000(15. 05.00)

Date of mailing of the international search report

25 MAY 2000 (25. 05. 00)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office
6, Xincheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-010-62019451

Authorized officer HUANG CHI

Telephone No.

(86-10)62093906



INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN00/00026

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO9613587	09. 05. 96	AU4013495	23.05.96
		EP078601	30.07.97
		US5656724	12.08.97
		US5789539	04.08.98
CN1202906	12.23.98	WO9711969	03.04.97
		AU7096396	17.04.97
		EP0860446	26.08.98
		JP9513294	24.11.98

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN00/00026

A. 主题的分类

Int.Cl⁷: C07K14/52, C12N15/19, A61K38/19

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

Int.Cl⁷: C07K, C12N, A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB, CNPAT

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	WO-A-9613587, 1996 年 5 月 9 日 见权利要求 1 - 16	1 - 20
A	CN1202906, 1998 年 12 月 23 日 见权利要求 1 - 13	1 - 20

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

“E” 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

“L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件: 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y” 特别相关的文件: 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

15.5 月 2000(15.5.2000)

国际检索报告邮寄日期

25.5月 2000(25.05.00)

国际检索单位名称和邮寄地址

国家知识产权局中国专利局
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

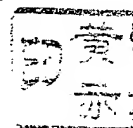
传真号:

86-010-62019451

受权官员

黄 赤

电话号码: (86-10)62093906



国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号

PCT/CN00/00026

检索报告中引用 的专利文献	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO 9613587	09.05.96	AU4013495	23.05.96
		EP078601	30.07.97
		US5656724	12.08.97
		US5789539	04.08.98
CN1202906	12.23.98	WO9711969	03.04.97
		AU7096396	17.04.97
		EP0860446	26.08.98
		JP9513294	24.11.98